バイオイメージングと相互作用解析特集

今回は『バイオイメージングと相互作用解析』を特集させていただきます。

近年、生体分子の機能解析手法は格段の進化を遂げ、実に様々な方法が使われ始めています。今号では、表面プラズモン共鳴センサーを用いる低分子化合物と高分子との相互作用イメージングに始まり、新規なYeast two-hybrid system、高効率なタンパク質の蛍光ラベリング法などについてご紹介させていただきます。また今号より、お客様方との技術交流の場といたしまして、『みんなの広場』というコーナーを新設予定です（P.21参照）。皆様、奮ってご参加いただきますよう、宜しくお願いいたします。

Products

MultiSPRinter® フォトリンカーチップ

SPRイメージング解析システムMultiSPRinter®に新しい解析用チップが登場しました。

新開発のフォトリンカーチップにより、低分子化合物を金チップへ簡便に固定化できるようになりました。SPRイメージング解析システムMultiSPRinter®を用いて、低分子固定化チップを解析することでタンパク質の低分子化合物への結合を観察できます。多種類の低分子化合物も効率よくSPR解析できます。（フォトリンカーチップは（独）理化学研究所との共同研究により開発いたしました。）

特長1 光親和型固定化チップ

・光反応性のアリールジアジリン基を利用しており、紫外線照射によって低分子化合物を金チップ上に固定化できます。
・化合物の官能基に依存せず結合するため、固定化された化合物の配向性はランダムです。

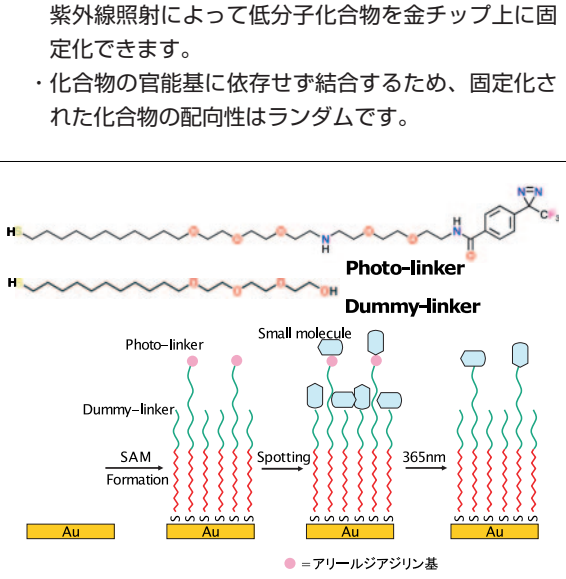
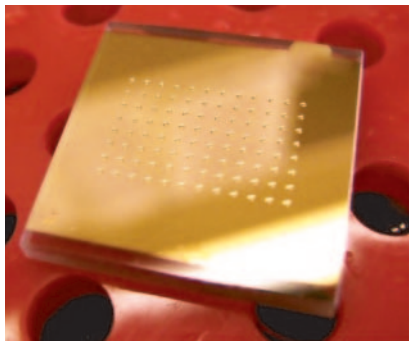


図1．金表面上の光親和型低分子固定化

特長2 96サンプルの同時解析

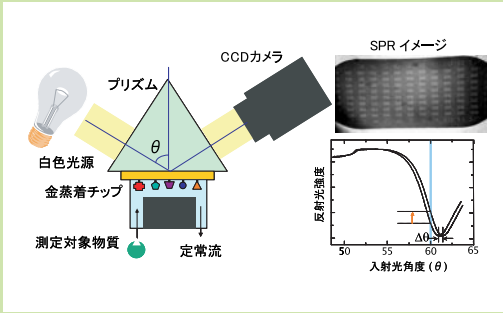
・専用スポッターを用いて96穴プレートに用意したサンプル溶液を1つのチップ上にスポットできます。
・96点までの同時解析が可能であり、ドラッグスクリーニングに好適です。



スポッティング直後の金チップ(18×18mm)

図2．サンプル溶液をスポットしたMultiSPRinter®Auチップ

Surface Plasmon Resonance Imaging System MultiSPRinter® は、96種類までの物質をチップ上にアレイ化することで、ラベルフリーかつリアルタイムに、複数の相互作用を同時に解析することができるシステムです。また、専用の自動スポッターを用いることで、96穴プレートに用意したサンプル溶液から簡便にアレイを作製できます。



SPRイメージングの原理
平行光である偏光光束をチップ全面に照射し、その反射光がCCDカメラでSPR像として撮影されます。相互作用により、SPR角がシフトし、反射光強度が変化します。SPR像の調べたい部分の反射光強度の変化を解析することで、複数の物質の相互作用解析が可能となります。

実施例1　6種類の低分子化合物と抗体との相互作用解析

図3に示す6種類の低分子化合物を紫外線照射によってフォトリンカーチップに固定化し、低分子化合物の抗体との相互作用を、SPRイメージングシステムMultiSPRinter®によって観察しました。低分子とその抗体の相互作用が検出でき、低分子化合物が金表面に固定化されていることが確認できただけでなく、シクロスポリンAとシクロフィリンAの相互作用も観察できました(図4)。

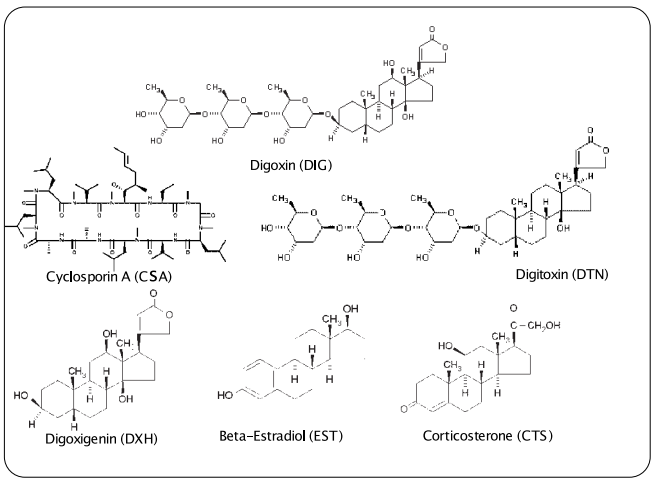
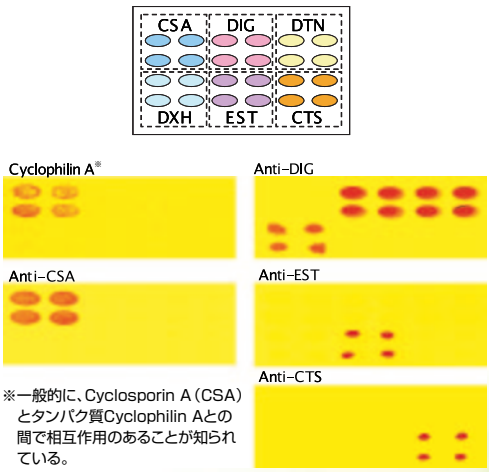


図3．低分子固定化（抗体による検出）に用いた低分子化合物



※一般的に、Cyclosporin A（CSA）とタンパク質Cyclophilin Aとの間で相互作用のあることが知られている。

図4．6種類の低分子化合物と抗体との相互作用解析

実施例2　8種類の低分子化合物とエストロゲンレセプターの相互作用解析

エストロゲンレセプター（ER）に結合することが知られている物質（内分泌かく乱化学物質）を含む8種類の低分子化合物（図5）をフォトリンカーチップに固定化し、ERαおよびERβとの相互作用をSPRイメージングシステムMultiSPRinter®によって観察しました。

その結果、ER結合性として知られている4種の物質（エストラジオール、タモキシフェン、4Hタモキシフェン、ジエチルスチルベストロール）で強い相互作用を観察できました（図6）。

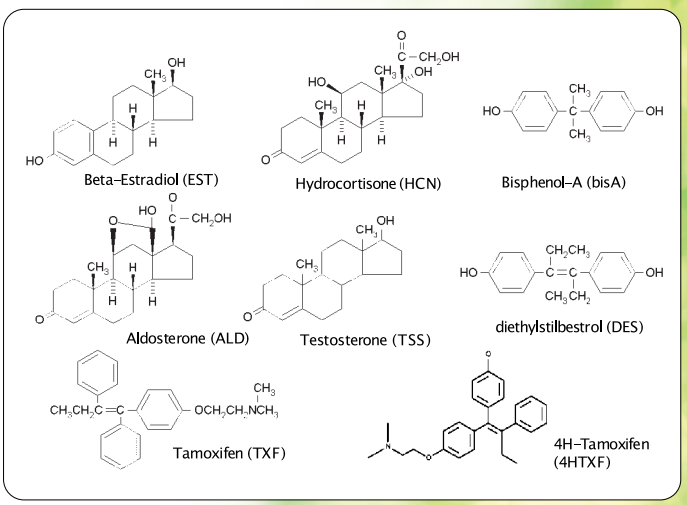


図5．内分泌かく乱化学物質とエストロゲンレセプター（ER）の結合解析に用いた低分子化合物

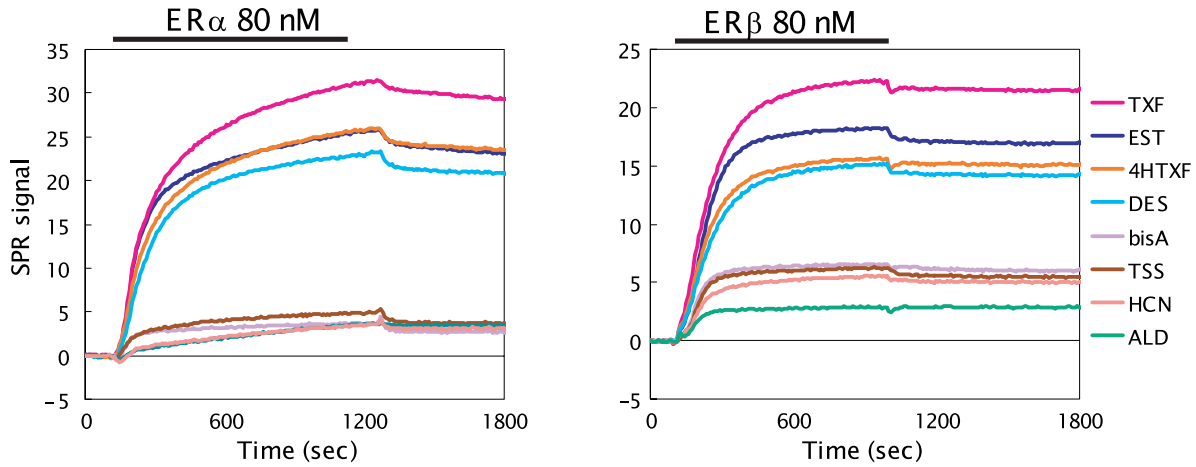


図6．8種類の低分子化合物とERの相互作用解析結果

参考文献

1）Brockman, J. M., Fruto, A. G. and Corn R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**: 8044-8051 (1999)
2）Nelson, B. P., Frutos, A. G., Brockman, J. M., Corn, R. M., *Anal. Chem.*, **71**(18): 3928-3934 (1999)
3）Brockman, J. M., Nelson, B. P. and Corn, R. M., Annu. *Rev. Phys. Chem.*, **51**: 41-63 (2000)
4）Kanoh, N., Kyo, M., Inamori, K., Ando, A., Asami, A., Nakao, A., Osada, H., *Anal. Chem., in press* (2006)

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MultiSPRinter® フォトリンカーチップ	1個	4℃	SPR-203	¥55,000
紫外線照射用治具（12枚用；フィルター3枚付）	1個	室温	SPR-2031	¥110,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Surface Plasmon Resonance Imaging System **MultiSPRinter® フルシステム** (SPRイメージング装置と自動スポッターのセット)	1式	−	SPR-101	¥16,000,000
MultiSPRinter® SPRイメージング装置	1台	−	SPR-102	¥12,000,000
MultiSPRinter® 自動スポッター装置	1台	−	SPR-103	¥4,500,000
MultiSPRinter® Auチップ	1個	4℃	SPR-200	¥6,000
MultiSPRinter® NH_2チップ	1個	4℃	SPR-201	¥20,000
MultiSPRinter® COOHチップ	1個	4℃	SPR-202	¥20,000
MultiSPRinter® 自動スポッター用96穴プレート	80回用	室温	SPR-401	¥29,000

Products

SNAP-cell™ 430 / SNAP-vitro™ 732, 747

SNAP-tag™の蛍光基質に新たな色が追加されました。さらに様々な実験へ用途が広まりました。

SNAP-tag™はHuman O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase（hAGT）を遺伝子工学的手法により改良した酵素タグです。蛍光基質や基質リンカーに共有結合を介して酵素反応で特異的に結合します（図1）。タグは約20kDaで、タンパク質のNおよびC末端に融合させることができます。SNAP-cell™キットによって*In vitro*イメージング（図2）やパルスチェイス実験、SNAP-vitro™キットによって蛍光タンパク質の調製（図3）などを行うことができます。

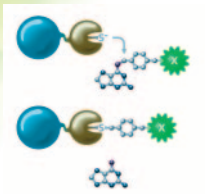


図1．蛍光基質との特異的結合
SNAP-tag™（金色）を融合したタンパク質（青色）と蛍光基質（緑色）との反応

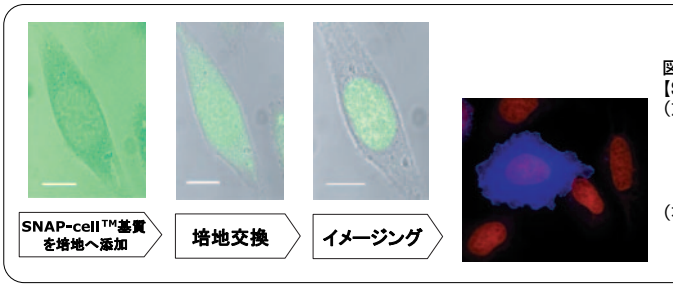
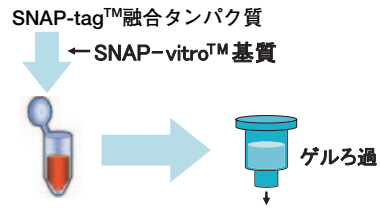


図2.インビトロイメージング
【SNAP-cell™キット使用】
（左）アッセイフロー。動物細胞で発現させた融合核局在タンパク質のSNAP-cell™505kitを用いた検出例（緑色）。基質を反応させた後、培地交換することにより、未反応基質を除去します。
（右）SNAP-cell™430kitを用いた検出例。CHO細胞のアクチンを検出しました（青色）。



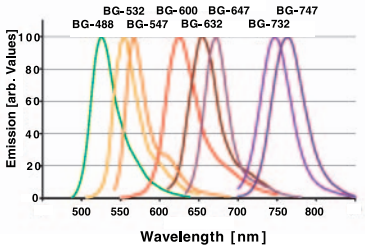


図3.タンパク質の蛍光ラベル
【SNAP-vitro™キット使用】
（左）蛍光タンパク質調製フロー。ラベル後、ゲルろ過によりフリーの基質を除去します。
（右）各SNAP-vitro™基質のEmissionスペクトル比較。本キットを用いることにより様々な波長の蛍光タンパク質を調製することができます。

	品　名	備　考	包装	保存温度	Code No.	価　格
危	**SNAP-cell™ 430 Starter Kit**	Ex 421nm, Em 444, 484 nm（Blue laser filter用）<青>	1kit	-20℃	CVSK072	¥100,000 NEW
危	**SNAP-cell™ 505 Starter Kit**	Ex 504 nm, Em 532 nm（fluorescein filter用）<緑>	1kit	-20℃	CVSK003	¥95,000
危	**SNAP-cell™ TMR-*Star* Starter Kit**	Ex 554 nm, Em 580 nm（rhodamine filter用）<赤>	1kit	-20℃	CVSK039	¥95,000
危	**SNAP-vitro™ 488 Starter Kit**	Ex 506 nm, Em 526 nm（fluorescein filter用）	1kit	-20℃	CVSK005	¥75,000
危	**SNAP-vitro™ 532 Starter Kit**	Ex 536 nm, Em 554 nm（rhodamine filter用）	1kit	-20℃	CVSK007	¥75,000
危	**SNAP-vitro™ 547 Starter Kit**	Ex 554 nm, Em 568nm（TAMRA or Cy3 filter用）	1kit	-20℃	CVSK041	¥75,000
危	**SNAP-vitro™ 600 Starter Kit**	Ex 606nm, Em 626 nm（Texas red filter用）	1kit	-20℃	CVSK013	¥80,000
危	**SNAP-vitro™ 632 Starter Kit**	Ex 637nm, Em 657 nm（635 nm diode laser用）	1kit	-20℃	CVSK015	¥85,000
危	**SNAP-vitro™ 647 Starter Kit**	Ex 660 nm, Em 673 nm（650 nm diode laser用）	1kit	-20℃	CVSK043	¥85,000
危	**SNAP-vitro™ 732 Starter Kit**	Ex 732 nm, Em 747 nm（Cy7 filter用）	1kit	-20℃	CVSK074	¥95,000 NEW
危	**SNAP-vitro™ 747 Starter Kit**	Ex 752 nm, Em 763 nm（Cy7 filter用）	1kit	-20℃	CVSK076	¥95,000 NEW

危本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級Ⅲ）であるDMSOが含まれます。可燃性がありますのでご注意ください。
※SNAP-tag™融合タンパク質の発現ベクター等の詳しい情報に関しましては、www.covalys.com/をご参照ください。

Products

GeneCopoeia™ Expressway to Discovery

OmicsLink™ SNAP-tag™ ORF Expression Clones

GeneCopoeiaのOmicsLink™ cloneにSNAP-tag™融合タンパク質発現用が加わりました。

ご好評いただいておりますGeneCopoeiaの発現用cDNAクローンにSNAP-tag™融合タンパク質発現用が新たに追加されました。16,000以上の完全長ヒトORFをNもしくはC末端SNAP-tag™融合タンパク質として発現させることができます。プロモーターとして、CMVおよびT7を有しており、それぞれの系で融合タンパク質を発現させることができます。インビトロイメージングもしくは蛍光タンパク質の調製に用いることができます。また、SNAP-Capture Resin S（Code No.:CVSK048）などを用いることにより、タンパク質をビーズへ固定化することも可能です。

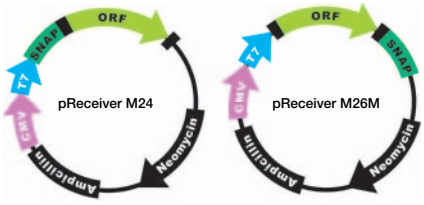


図1.プラスミドマップ

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
OmicsLink™ SNAP-tag™ ORF Expression Clones	2μg	-20℃	–	¥180,000 NEW

※クローンの詳しい情報に関しましては、www.genecopoeia.com/をご参照ください。

Products

AnaTag™ Protein Labeling Kits

高効率かつ簡便なタンパク質ラベル化キットです。抗体の蛍光ラベリング等に最適です。

アミノ基を介したタンパク質のラベル化キットです。様々な蛍光基やビオチンをタンパク質のアミノ基に高効率で結合します。
HiLyte Fluor™蛍光色素を用いることにより、従来に比べ明るく安定な蛍光タンパク質を調製することが可能です。

特長1 抗体のラベリングに最適

・抗体のラベル等に用いることができます。高効率でラベル可能なプロトコールが添付されています。

特長2 様々な蛍光色素やビオチンによるラベルが可能

・HiLyte Fluor™シリーズをはじめ様々な蛍光色素やビオチンでタンパク質をラベルすることができます。

特長3 簡便

・ラベリングに必要な試薬や器具がすべて含まれており、簡便にタンパク質をラベル化することができます。

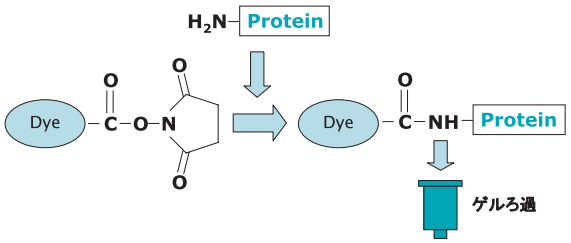


図1．ラベル化原理およびフロー
スクシイミドエステル化された色素とタンパク質のアミノ基が高効率反応します。反応後、ゲルろ過を用いて、未反応色素を除去します。

ーロメモ

HiLyte Fluor™色素はAnaSpec社で開発された高性能蛍光色素です。光耐性、および蛍光強度 に優れるという特長を有しています。
他社高性能蛍光色素との対応は以下のとおりです。

HiLyte Fluor™シリーズ	他社高性能色素
HiLyte Fluor™ 488	Cy™ 2, Alexa Fluor™ 488
HiLyte Fluor™ 555	Cy™ 3, Alexa Fluor™ 555
HiLyte Fluor™ 647	Cy™ 5, Alexa Fluor™ 647
HiLyte Fluor™ 680	Cy™ 5.5, Alexa Fluor™ 680
HiLyte Fluor™ 750	Cy™ 7, Alexa Fluor™ 750

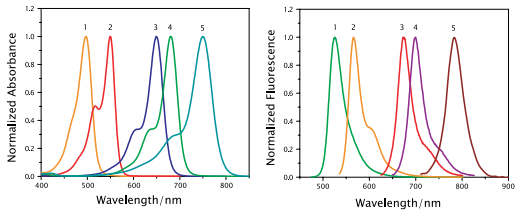


図2．HyLite Fluor™ 蛍光スペクトル比較
左図：Normalized absorption、右図：Fluorescence
1：488 acid、2：555 acid、3：647 acid、4：680 acid、5：750 acid
[PBS buffer中]

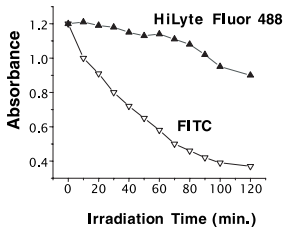


図3．HyLite Fluor™ 488とFITCにおける光耐性の比較

	品名及び内容	Ex/Em (nm)	包装	保存温度	Code No.	価格
危	**AnaTag™ AMCA-X Protein Labeling Kit** ・Amino reactive dye×5本 ・Reaction buffer: 0.5ml ・Spin column×5個 ・DMSO: 1 ml ・Elution buffer:10 ml ・Wash tube×5個 ・Collect tube×5個	347/447	5回用 (5mg protein/回)	-20℃	AS71000	¥39,000
危	**AnaTag™ 5-FAM Protein Labeling Kit**	495/520	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71001	¥39,000
危	**AnaTag™ 5-TAMRA Protein Labeling Kit**	555/581	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71002	¥39,000
危	**AnaTag™ 5-ROX Protein Labeling Kit**	573/602	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71005	¥39,000
危	**AnaTag™ HiLyte Fluor™ TR Protein Labeling Kit**	591/622	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71006	¥39,000
危	**AnaTag™ HiLyte Fluor™ 555 Protein Labeling Kit**	553/568	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71007	¥59,000
危	**AnaTag™ HiLyte Fluor™ 647 Protein Labeling Kit**	652/669	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71008	¥59,000
危	**AnaTag™ Biotin Protein Labeling Kit**	—	5回用(5mg protein/回)	-20℃	AS71003	¥39,000

危本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級Ⅲ）であるDMSOが含まれます。可燃性がありますのでご注意ください。

関連商品

品名及び内容	Ex/Em (nm)	包装	保存温度	Code No.	価格
HiLyte Fluor™ 488 acid, succinimidyl ester	502/527	5mg	-20℃	AS81161	¥59,000
HiLyte Fluor™ 555 acid, succinimidyl ester	552/569	1mg	-20℃	AS81251	¥59,000
HiLyte Fluor™ 647 acid, succinimidyl ester	649/674	1mg	-20℃	AS81256	¥29,000
HiLyte Fluor™ 680 acid, succinimidyl ester	678/699	1mg	-20℃	AS81261	¥39,000
HiLyte Fluor™ 750 acid, succinimidyl ester	754/778	1mg	-20℃	AS81266	¥39,000

Products

Labeled Secondary Antibodies

イメージングに最適なHiLyte Fluor™標識2次抗体です。

様々な1次抗体に対応するラベル化2次抗体です。実験内容に応じて、様々な組み合わせで検討を行うことが可能です。

特長1 幅広い用途で使用可能

・ウェスタンブロッティング、FACS、ELISA、IHC（免疫組織染色）等に幅広く用いることができます。

特長2 様々な1次抗体に対応

・抗マウス、ヤギ、ニワトリ抗体を組み合わせてご使用いただくことで、多色検出等も可能です。

特長3 種々のラベル抗体を選択可能

・種々のラベル化抗体を揃えています。HyLite Fluor™ラベル化抗体を用いての初期評価にはサンプラーキットが最適です。

実施例1 他社色素との蛍光強度の比較例

HiLyte Fluor™ 647とA社高性能蛍光色素でラベルした抗体を、等モル条件で蛍光強度の比較を行いました。その結果、HiLyte Fluor™が高い蛍光強度を示すことが示されました。

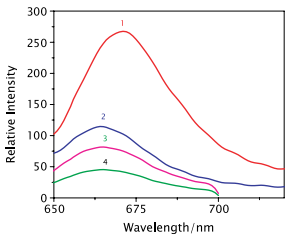


図1．相対蛍光度比較
1：HiLyte Fluor™ 647ラベル goat anti-rabbit IgG
2〜4：A社高性能蛍光色素ラベル goat anti-rabbit IgGs
(2:in-house conjugate、3:A社 and 4:B社)

実施例2 蛍光組織染色例

ヒトアルツハイマー病患者の脳（海馬）の組織切片を、mouse monoclonal anti-β-amyloid-1-11 antibody（Code No.: AS29547）とrabbit anti-Tau antibody cocktail（Code No.: AS29582）で処理した後、HiLyte Fluor™ 555（赤色）conjugated goat-anti-mouse IgG（Code No.: AS61057-H555）およびHiLyte Fluor™ 488（緑色）conjugated goat-anti-rabbit IgG（Code No.: AS61056-H488）と反応させイメージングを行いました。
その結果、鮮明な染色結果を得ることができました。

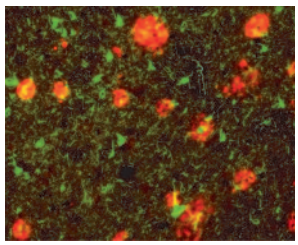


図2．アルツハイマー病の脳（海馬）切片の蛍光組織染色例
（ブリティッシュコロンビア大Patrick L. NcGeer先生からご提供いただきました。）

〈単品〉

品 名	包装	保存温度	Goat anti-mouse IgG (H+L) Code No.	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Code No.	価 格	Rabbit anti-mouse IgG (H+L) Code No.	Rabbit anti-goat IgG (H+L) Code No.	価 格	Rabbit anti-chichen IgY Code No.	価 格
Unconjugated	1mg	-20℃	AS28172	AS28176	¥12,000	AS28164	AS28168	¥14,000	AS29709	¥14,000
Biotinylated	500μg	-20℃	AS28175	AS28179	¥13,000	AS28167	AS28171	¥13,000	AS29712	¥14,000
HiLyte Fluor™ 488-labeled	500μg	-20℃	AS28175-H488	AS28172-H488	¥13,000	AS28164-H488	AS28168-H488	¥13,000	AS29709-H488	¥14,000
HiLyte Fluor™ 555-labeled	500μg	-20℃	AS28175-H555	AS28172-H555	¥13,000	AS28164-H555	AS28168-H555	¥13,000	AS29709-H555	¥14,000
HiLyte Fluor™ 647-labeled	500μg	-20℃	AS28175-H647	AS28172-H647	¥13,000	AS28164-H647	AS28168-H647	¥13,000	AS29709-H647	¥14,000

※この他にFAM、TAMRA、AMCA、FITC標識抗体がございます。詳しくはお問い合わせください。

〈サンプラーキット〉

品 名	備 考	包 装	保存温度	Code No.	価 格
HiLyte Fluor™ Labeled Secondary Antibody Sampler kit *Goat anti-mouse and Goat anti-rabbit IgG, Highy Cross adsorbed*	対応する1次抗体：Mouse, Rabbit Label: HiLyte Fluor™ 488,555,647	6×50μg	-20℃	AS72001-50	¥19,000 NEW
HiLyte Fluor™ Labeled Secondary Antibody Sampler Kit* Rabbit anti-mouse and Rabit anti-goat IgG*	対応する1次抗体：Mouse, Goat Label: HiLyte Fluor™ 488,555,647	6×50μg	-20℃	AS72000-50	¥19,000 NEW
HiLyte Fluor™ Labeled Secondary Antibody Sampler Kit* Goat anti-mouse and Goat anti-rabbit IgG*	対応する1次抗体：Mouse, Rabbit Label: HiLyte Fluor™ 488,555,647	6×50μg	-20℃	AS72002-50	¥19,000 NEW

関連商品

品名及び内容	包 装	保存温度	Code No.	価 格
***Can Get Signal*® immunostain Starter Set** Solution A、Solution B	各5ml×1本	4℃	NKB-401	¥12,000

※*Can Get Signal*® immunostainは、免疫組織染色における抗体反応を促進するよう至適化された抗体用バッファーです。Starter Setには、反応促進効果の異なるSolution AとSolution Bの2種類の試薬がセットになっています。
お持ちの抗体に対して、より適した試薬を選択することができます。それぞれ単品販売もあります。お問い合わせください。

Products

Dualsystems社 Yeast two-hybrid system

DUALmembrane Yeast two-hybrid system

膜タンパク質間相互作用を高感度で検出。画期的な Yeast two-hybridシステムです。

スプリットユビキチン法を用いたYeast two-hybridシステムです。膜タンパク質（膜関連タンパク質）間の相互作用を高感度で検出することができます。薬剤の主要ターゲットである膜タンパク質の相互作用研究にご使用いただけます。

特長1 膜タンパク質間の相互作用を検出可能

・スプリットユビキチン法を用いることにより、今まで困難だった膜タンパク質間の相互作用を検出することができます。

特長2 高感度

・人工転写因子（LexA-VP16）、および高感度な3種のレポーター遺伝子（HIS3, ADE2, lacZ）を有する酵母株（NMY51）を用いることにより、高感度かつ特異性の高い相互作用の検出が可能です。

特長3 確実

・Bait作製用ベクターが充実しており、酵母で膜タンパク質がER膜へ確実に移行できるようにSUC2やSTE2などのリーダーシーケンスをN末端に付加可能なベクターなどを多数揃えています。また、コントロール実験により、Baitに用いる膜タンパク質の向きの妥当性等の検討を行いながら実験を進めることができます。すべてのベクターはユニークな*Sfi*Iサイトを有しており、効率的に遺伝子をサブクローニングすることができます。

・Baitの発現は、抗LexA抗体を用い、ウェスタンブロッティング等で確認することができます。Preyの発現はHAタグを指標にして確認可能です。

特長4 簡便

・N末端側およびC末端側にNubG配列を有するPrey用のライブラリーを多種揃えています。受託によるライブラリー構築サービスも行っております。

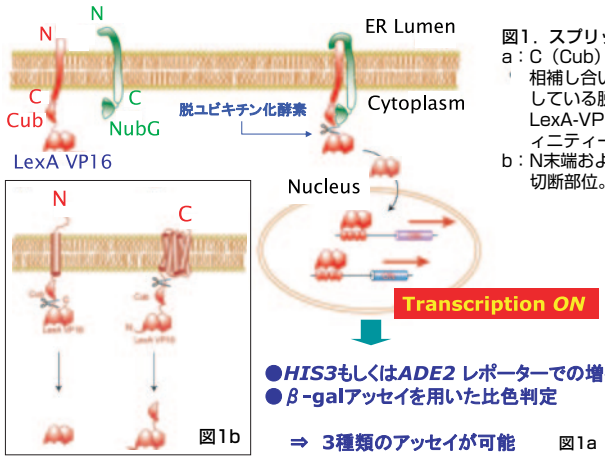


図1．スプリットユビキチンシステム原理
a：C（Cub）およびN側ドメイン（Nub）に分割されたユビキチンドメインは接近することにより相補し合いタンパク質を再構築します。一方、ユビキチンへ接合したタンパク質は酵母内で発現している脱ユビキチン化酵素で切断を受けることが知られています。左図のように、切断されたLexA-VP16は核へ移行しレポーター遺伝子を活性化します。本アッセイではCubに対するアフィニティーを改変されたNubG変異体が使用されます。
b：N末端およびC末端融合Baitにおける、切断部位。（Preyは省略して記載）

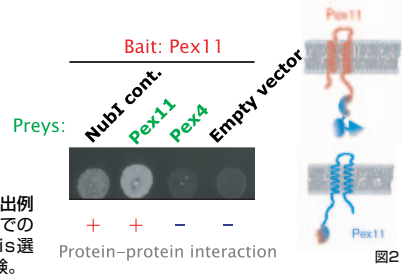


図2．検出例
Pex11タンパク質間での相互作用の検出。His選択培地による増殖試験。

参考文献
1）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**（20）：7121-7126（2005）
2）*J. Biol. Chem.*, **280**（24）：22917-22924（2005）

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
pBT3-N bait vector for type Ⅱ baits	5μg	-20℃	DSP03230	¥109,000
pBT3-C bait vector	5μg	-20℃	DSP03231	¥109,000
pBT3-SUC bait vector for type Ⅰ baits	5μg	-20℃	DSP03232	¥109,000
pBT3-STE bait vector for type Ⅰ baits without signal sequence	5μg	-20℃	DSP03233	¥109,000
pPR3-N prey vector	5μg	-20℃	DSP03234	¥109,000
pPR3-C prey vector	5μg	-20℃	DSP03235	¥109,000
pPR3-SUC prey vector for type Ⅰ preys	5μg	-20℃	DSP03236	¥109,000
pPR3-STE prey vector for type Ⅰ preys without signal sequence	5μg	-20℃	DSP03237	¥109,000
Vector control set ・pCCW-Alg5, pAI-Alg5, pDL2-Alg5	1set（各5μg）	-20℃	DSP03238	¥109,000

品 名 及 び 内 容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
NMY5 yeast reporter strain [MATa his3Δ200trip-901leu2-3,112 ade2LYS2::（lexAop）4-HIS3ura::（lexAop）8-lacZ ade2::（lexAop）8-ADE2 GAL4] <凍結乾燥品>	1本	室温	DSP04005	¥115,000
DUALmembrane kit 3 ・pBT3-N, pBT3-C, pBT3-SUC, pBT3-STE, pPR3-N, pPR3-C, pPR3-SUC, pPR3-STE, pCCW-Alg5, pAI-Alg5, pDL2-Alg5, NMY5	1 kit	-20℃	DSP01001	¥572,500
DUALmembrane starter package ・DUALmembrane kit 3, HTX beta-galactosidase assay kit, DS Yeast transformation kit	1 kit	-20℃	DSP09901	¥641,500
DUAL membrane Western blotting control extracts（bait extract, prey extract）	50μl×2本	-20℃	DSP06002	¥26,000
Lex A（2-12）<抗LexA モノクローナル抗体 IgG1>【Santa Cruz製】	200μg/ml	-20℃	SASC7544	¥54,000

※営利団体・企業にご所属の方は、DUALmembrane kit 3、およびDUALmembrane starter packageをご購入いただく前に、Dualsystems Biotech社からライセンスを受ける必要があります。また、本システムを営利目的で使用される場合、別途ライセンス交渉が必要な場合があります。お問い合わせください。

DUALhybrid Yeast two-hybrid system

高効率なYeast two-hybridシステムです。Three-hybrid解析へも応用可能です。

古典的なY2Hシステムに様々な改良を加えた効率的なシステムです。可溶性タンパク質間の相互作用を高感度に検出します。

特長1　確実

・LexA DNA binding domain（DBD）のC末端側およびN末端側にBait配列を連結することができます。より確実に相互作用を確認することが可能です。
・Baitの発現は、抗LexA抗体を用い、ウェスタンブロッティング等で確認することができます。Preyの発現はHAタグを指標にして確認可能です。

特長2　高感度

・高感度な3種のレポーター遺伝子（HIS3，ADE2，lacZ）を有する酵母株（NMY51）を用いることにより、高感度かつ特異性の高い相互作用の検出が可能です。

特長3　柔軟

・Gal4アクティベーティングドメイン（AD）を連結したpreyを発現する市販ライブラリーも用いることができます。

特長4　Three-hybrid解析可能

・pY3H bridgeベクターを用いることにより、BaitとPreyの相互作用を仲介する分子のスクリーニングも可能です。

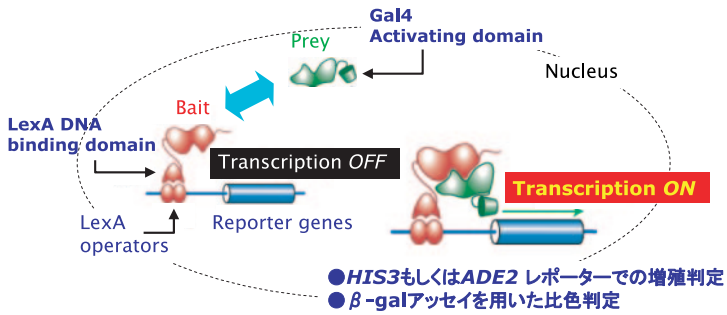


図1．DUALhybrid system原理

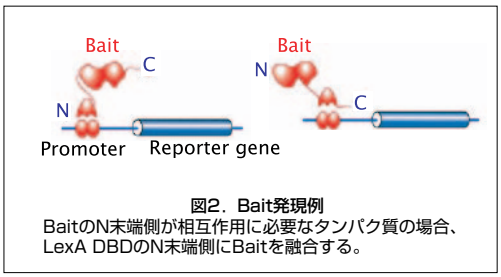


図2．Bait発現例
BaitのN末端側が相互作用に必要なタンパク質の場合、LexA DBDのN末端側にBaitを融合する。

参考文献　1）*J. Biol. Chem.*, **279**（16）：16503-16510（2004）

品 名 及 び 内 容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
pLexA-N bait vector	5μg	-20℃	DSP03105	¥70,000
pLexA-C bait vector	5μg	-20℃	DSP03106	¥70,000
pGAD-HA prey vector	5μg	-20℃	DSP03103	¥70,000
pY3H bridging vector	5μg	-20℃	DSP03104	¥70,000
DUALhybrid control plasmid set ・pLexA-p53 control bait, pLexA-lamin C control bail, pACT-large T control prey	1set（各5μg）	-20℃	DSP03107	¥70,000
NMY5 yeast reporter strain [MATa his3Δ200trip-901leu2-3,112 ade2LYS2::（lexAop）4-HIS3ura::（lexAop）8-lacZ ade2::（lexAop）8-ADE2 GAL4] <凍結乾燥品>	1本	室温	DSP04005	¥115,000
DUALhybrid kit ・pLexA-N, pLexA-C, pGAD-HA, pLexA-p53, pLexA-lamin C, pACT-large T, NMY5	1 kit	-20℃	DSP01004	¥168,000

※DUALhybrid systemを用いるY2H解析はニューヨーク州立大の特許〈US5,283,173、US5,468,614〉によってカバーされております。営利目的での使用の場合、ライセンス交渉が必要な場合がありますので、ご注意ください。

DUAL Libraries

〈DUALmembrane Yeast two-hybrid system用preyライブラリー〉

品　　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
Human adult brain cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02203	¥455,000
Human embryonal brain cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02213	¥455,000
Human adult colon cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02215	¥455,000
Human adult liver cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02216	¥455,000
Jurkat T cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02205	¥455,000
HeLa cell line cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02212	¥455,000
Mouse adult heart cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02207	¥455,000
Mouse adult brain cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02201	¥455,000
S. cerevisiae cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02202	¥455,000
Drosophila melanogaster whole adult cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02214	¥455,000
Arabidopsis thaliana cDNA library / NubG-x	100μg×2本*	-20℃	DSP02210	¥455,000
Human adult kidney cDNA library / x-NubG	100μg×2本*	-20℃	DSP02208	¥455,000
Human adult liver cDNA library / x-NubG	100μg×2本*	-20℃	DSP02209	¥455,000
Mouse adult heart cDNA library / x-NubG	100μg×2本*	-20℃	DSP02206	¥455,000
Saccharomyces cerevisiae cDNA library / x-NubG	100μg×2本*	-20℃	DSP02211	¥455,000
ライブラリー構築サービス	お問い合わせください			

*：約7回分のスクリーニングに対応します。
※NubG-xで示されたライブラリーはPreyのN末端側にNubG配列を、x-NubGのものはPreyのC末端側にNubG配列を有しています。

〈DUALhybrid Yeast two-hybrid system用preyライブラリー〉

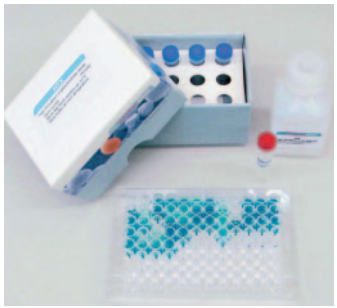
品　　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
Mouse embryo cDNA library	100μg×2本*	-20℃	DSP02101	¥300,000
Human adult colon cDNA library	100μg×2本*	-20℃	DSP02102	¥300,000
HeLa cell line cDNA library	100μg×2本*	-20℃	DSP02103	¥300,000
ライブラリー構築サービス	お問い合わせください			

*：約7回分のスクリーニングに対応します。
※ライブラリーはすべて、PreyのN末端側にGal4 AD配列を有しています。
※市販のGal4 AD融合タンパク質を発現するpreyライブラリー（Clontech社 Matchmaker™ libraryなど）もご利用いただけます。

HTX beta-galactosidase assay kit

Y2H解析のβ-ガラクトシダーゼアッセイを定量化する簡便なシステムです。

Y2H解析におけるβ-ガラクトシダーゼ活性を簡便に定量化するためのキットです。
DUALmembrane やDUALhybrid systemでの検出に最適です。

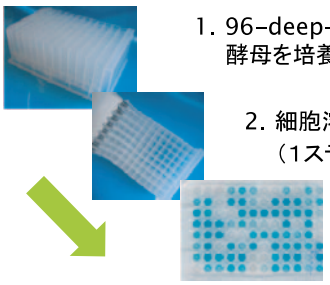


特長1 簡便

・一般的に広く行われているフィルターリフト法に比べ、簡便にアッセイすることができます。

特長2 正確

・安定・正確な定量データを得ることができます。半定量プロトコールと定量プロトコールを用いることができます。



1. 96-deep-well プレートで酵母を培養（OD_{545}測定）
2. 細胞溶解および基質添加（1ステップ）
3. A_{615}測定

図1. 定量プロトコールでのアッセイフロー

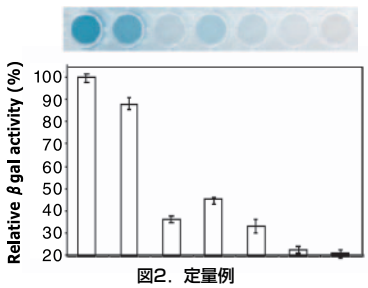


図2. 定量例

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
HTX beta-galactosidase assay kit	96×2ウェル分	-20℃、室温	DSP01002	¥39,500

DS Yeast transformation kit

高効率で酵母をトランスフォーメーション。Y2Hシステム用の遺伝子導入に最適です。

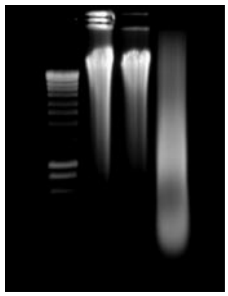
高効率かつ簡便な酵母形質転換用キットです。DUALmembrane やDUALhybrid systemでの形質転換に最適です。

特長1 高効率

・キャリアーDNAの純度を高めることによって、形質転換の効率を高めています。(5×10^5～2×10^{6}clones/μg DNA)

特長2 簡便・便利

・小スケールプロトコールと高効率プロトコール（ライブラリー調製用）の2種類のプロトコールが準備されており、必要に応じた簡便な形質転換が可能です。



Lane 1：DNAマーカー
Lane 2：2μg carrier DNA（本キット）
Lane 3：　〃　（5日間室温放置）
Lane 4：2μg carrier DNA（A社品）

図1. Carrier DNAのサイズ・純度比較

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
DS Yeast transformation kit	1 kit*	-20℃、室温	DSP01003	¥39,500
Single-stranded carrier DNA	1ml×3本	-20℃	DSP06001	¥27,000

*:ライブラリー形質転換5回分に対応します。
※各製品の詳細に関しましては、http://www.dualsystems.com/をご参照ください。

Products

QTL BIOSYSTEMS

QTL LightSpeed® Universal Assay Development Kit

抗体・プロテアーゼ等を使用しない高性能なホモジニアスプロテインキナーゼ、ホスファターゼ活性測定システムです。

任意のTAMRAラベル基質ペプチドを準備いただくことで（図1）、任意のプロテインキナーゼ、ホスファターゼのハイスループットアッセイシステムを簡便に構築することができます。阻害剤アッセイ、基質スクリーニング等に最適です。

特長1 抗体不要・洗浄不要

・スーパークエンチング法（図1）を用いるため洗浄工程が不要です。

特長2 一般的な蛍光プレートリーダーを用いて解析が可能

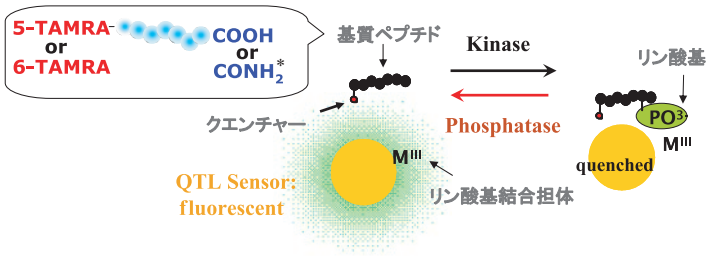


図1. スーパークエンチングを用いたアッセイ原理

QTLセンサー粒子表面のリン酸基結合担体（M^{III}）にリン酸化されたペプチドのリン酸基が結合することにより、ペプチド末端のクエンチャー（TAMRA等）がQTLセンサー表面の蛍光ポリマーに接近するため、蛍光が消光します。〈490nm〉（キナーゼアッセイ）。同時に、600nmの蛍光が放出され（エンハンスドエミッション）、2波長を測定することにより、より正確な阻害剤測定を行うことができます。（*:アミド化末端ペプチドの方が良好な結果を示すことがあります。）

実施例1 PKCαの阻害剤（84種）アッセイ

384プレートを用いて84種類の化合物のPKAαに対する阻害活性を調べました。結果、R0318220およびGF109203Xの2化合物に阻害活性を認めました。

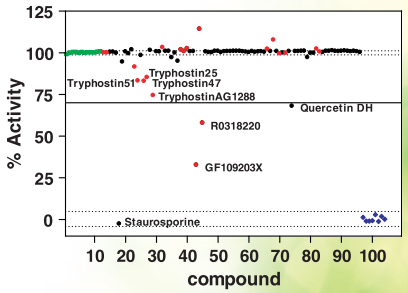


図2. 490/600nm比から算出したPKCα活性値（n=3）
励起：450nm、
測定：490nm（クエンチング）、600nm（エンハンスドエミッション）
緑：N.C、青：P.C（Staurosporine）、赤：着色・蛍光物質
基質ペプチド配列：5-TAMRA-RFARKGSLRQKNV-NH$_2$

参考文献 1）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(43): 15295-15300 (2004)

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
危 **QTL LightSpeed® Universal Assay Development Kit** ・Non-phosphorylated peptide control ・Phosphorylated peptide control ・Post-reaction buffer ・10×Sensor ・Sensor Dilution Buffer	400回用(30μl) 800回用(30μl) 〈384ウェル用〉	4℃	QTK025K004 QTK025K008	¥180,000 ¥287,000

危 本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級Ⅲ）であるDMSOが含まれます。可燃性がありますのでご注意ください。
※詳しい情報に関しましては、www.qtlbio.comをご参照ください。他にも様々なタイプのアッセイキットがございます。

Products

Labeled protein kinase substrates

プロテインキナーゼの活性測定に最適な高純度N末端ビオチン化ペプチドとTAMRA標識ペプチドです。

TAMRA標識ペプチドはQTL LightSpeed® Universal Assay Development Kitの検討用としてもご使用いただけます。

Product Name（Biotin- or 5-TAMRA-）	容量	配　列	Biotin-		5-TAMRA-		関連する
			Code No.	価　格	Code No.	価　格	
CREBtide	1mg	KRREILSRRPSYR	AS23986	¥29,000	AS60511-1*	¥59,000	PKA
Kemptide	1mg	LRRASLG	AS60527	¥25,000	AS29934-1*	¥53,000	PKA
PKA/PKC/MAPKAP-K1 Substrate	1mg	RRRLSSLRA-NH_2**	AS60028-1*	¥28,000	AS29984-1*	¥47,000	PKA/C
PKCμ Substrate	1mg	AALVRQMSVAFFFK	AS29927-1*	¥24,000	AS29926-1*	¥60,000	PKC
PKC Substrate 5	1mg	RRGRTGRGRRGIFR	AS60545-1*	¥29,000	AS60544-1*	¥59,000	PKC
PKCδ Substrate	1mg	RFAVRDMRQTVAVGVIKAVDKK	AS60534-1*	¥29,000	AS60562-1*	¥59,000	PKC
Protein Kinase Cε Substrate	1mg	ERMRPRKRQGSVRRRV	AS60532-1*	¥29,000	AS60531-1*	¥59,000	PKC
MARCKS Protein (154-165)	1mg	KKRFSFKKSFKL	AS29918-1*	¥20,000	AS29916-1*	¥56,000	PKC
Glycogen Synthase (1-8)	1mg	PLSRTLSVAAKK-NH_2**	AS29915-1*	¥20,000	AS29914-1*	¥56,000	PKC
Neurogranin (28-43)	1mg	AAKIQASFRGHMARKK	AS29991-1*	¥24,000	AS29992-1*	¥60,000	PKC
PKG Substrate 1	1mg	QKRPRRKDTP	AS29996-1*	¥33,000	AS29995-1*	¥52,000	PKG
PKG Substrate 2	1mg	RKRSRAE	AS60301-1*	¥16,000	AS60300-1*	¥65,000	PKG
BPDEtide	1mg	RKISASEFDRPLR	AS60509-1*	¥29,000	AS60508-1*	¥59,000	PKG
Autocamtide-2	1mg	KKALRRQETVDAL	AS29930-1*	¥21,000	AS29932-1*	¥57,000	CaMK
Autocamtide-3	1mg	KKALHRQETVDAL	AS29975-1*	¥20,000	AS29976-1*	¥56,000	CaMK
Syntide 2	1mg	PLARTLSVAGLPGKK	AS29986-1*	¥24,000	AS29987-1*	¥59,000	CaMK
Glycogen Synthase (1-10)	1mg	PLSRTLSVSS-NH_2**	AS60517-1*	¥29,000	AS60516-1*	¥59,000	CaMK
CaM KinaseⅡ Substrate (281-291)	1mg	MHRQETVDCLK-NH_2**	AS29957-1*	¥18,000	AS29955-1*	¥53,000	CaMK
AKT Substrate	1mg	ARKRERTYSFGHHA	AS29945-1*	¥23,000	AS60505-1*	¥59,000	AKT
Crosstide	1mg	GRPRTSSFAEG	AS60513-1*	¥29,000	AS60262-1*	¥59,000	AKT
CDK1 Substrate	1mg	HATPPKKKRK	AS60525-1*	¥29,000	AS60524-1*	¥59,000	CDK
CDK5 Substrate	1mg	PKTPKKAKKL	AS60027-1*	¥18,000	AS29981-1*	¥52,000	CDK
Protein Kinase p34 (cd2) Substrate	1mg	ADAQHATPPKKKRKVEDPKDF	AS29919-1*	¥36,000	AS29920-1*	¥77,000	CDK
MAP Kinase Substrate 3	1mg	KQAEAVTSPR	AS60297-1*	¥17,000	AS60296-1*	¥66,000	MAPK
EGF Receptor (661-681)	1mg	KRELVEPLTPSGEAPNQALLR-NH_2**	AS29966-1*	¥38,000	AS29967-1*	¥70,000	MAPK
GSK-3β Peptide	1mg	GPHRSTPESRAAV	AS60521-1*	¥29,000	AS60520-1*	¥59,000	GSK
Casein KinaseⅠ Substrate	1mg	RRKDLHDDEEDEAMSITA	AS60550-1*	¥29,000	AS60549-1*	¥59,000	CK
Casein KinaseⅡ Substrate 2	1mg	RRADDSDDDDD	AS60540-1*	¥29,000	AS60539-1*	¥59,000	CK
Tyrosine Kinase Peptide 1	1mg	KVEKIGEGTYGVVYK	AS60286-1*	¥29,000	AS29935-1*	¥68,000	EGFR
Tyrosine Kinase Peptide 1, amide	1mg	KVEKIGEGTYGVVYK-NH_2**	AS23988	¥22,000	-	-	
EGFR Protein Tyrosine Kinase Substrate	1mg	ADEYLIPQQ	AS29936-1*	¥30,000	AS29940-1*	¥56,000	EGFR
Tyrosine Kinase Peptide 3	1mg	RRLIEDAEYAARG	AS22979	¥16,000	-	-	EGFR
Tyrosine Kinase Peptide 3, amide	1mg	RRLIEDAEYAARG-NH_2**	AS29990-1*	¥12,000	AS29989-1*	¥58,000	
p60c-src Substrate Ⅰ	1mg	YIYGSFK	AS60536-1*	¥20,000	AS60529-1*	¥59,000	SRC
Insulin Receptor (1142-1153)	1mg	TRDIYETDYYRK	AS24629	¥24,000	-	-	INSR
Insulin Receptor (1142-1153), amide	1mg	TRDIYETDYYRK-NH_2**	AS23998	¥30,000	-	-	

* Code No.の末尾が"-1"となっているものは、5mgの品揃えがございます。
**配列の末尾が-NH_2となっているペプチドはC末端のカルボシル基がアミド化されています。
※非ラベルペプチド、FAM（緑色蛍光）ラベルペプチドも扱っております。お問い合わせください。

一口メモ

ホモジニアス酵素活性測定キット

QTL LightSpeed® Assay Kit

QTL LightSpeed® Assay Kitシリーズは、「スーパークエンチング技術」を用いるホモジニアス酵素活性測定キットです。各キットにはそれぞれ基質がセットになっておりますが、基質を含まない『QTL LightSpeed® Universal Assay Development Kit』を購入いただくことで、各自オリジナルのプロテインキナーゼ／ホスファターゼアッセイ系を構築することができます。蛍光標識ペプチド基質を別途ご準備していただく必要がありますが、AnaSpec社の蛍光ラベル化ペプチドを用いて検討いただくことも可能です。詳しくは本誌、P.10をご参照ください。

主な酵素	説明（Non-labeled peptideに対する知見です）	参考文献
	cAMP response element binding（CREB）proteinに由来する基質です。	*Nucleic Acids Res.*, **20**: 6106 (1992)
	PKAに対する優れた基質です（Km=16μM）。PKA以外にも様々なキナーゼの基質になります。	*Insect Biochem., Mol. Biol.*, **32**: 505 (2002) *Eur. J. Biochem.*, **252**: 245 (1998)
MAPK	ヒト40S ribosome S6の231-239に相当する基質です。PKA、PKC、およびp90rsk kinase（MAPKAP-K1）の基質となります。	*Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A., **83**: 5968 (1986), *FEBS Lett.*, **175**: 219 (1984), *J. Biochemistry*, **42**: 849 (2003)
	PKCμ特異的基質です。	*J. B. C.*, **278**: 319 (2003), *J. B. C.*, **277**: 45451 (2002), *J. B. C.*, **272**: 952 (1997)
	PKCに高度に特異的な基質の一つです。Hepatitis C virus（HCV）の非構造タンパク質3の1487-1500に相当します。 組織や細胞のクルードエキストラクト中のPKCの活性を測定するのに有用です。	*J. B. C.*, **381**: 19-27 (2000), *J. B. C.*, **274**: 30722-8 (1999)
	PKCδ特異的な基質です（Km=22.9μM）。431にThrを有するマウスeEF-1aの422-443に由来します。Arg429がPKCδの基質認識（特異性）に重要な役割を果します。	*J. B. C.*, **277**: 41850 (2002), *J. B. C.*, **270**: 6156 (1995), *J. B. C.*, **266**: 14390 (1991)
	PKCεに対して高い特異性を示す人工基質です（Km=68μM）。	*J. B. C.*, **265**: 7301 (1990), *FEBS Lett.*, **243**: 351 (1989)
	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate（MARCKS）に由来します。本基質は、protein kinase C（PKCα、β、天然由来のPKCδ、ε、θやatypical PKCξ）の幅広い基質となることが調べられています。	*Pharmacol. Ther.*, **93**: 271 (2002), *J. B. C.*, **272**: 4072 (1997), *J. B. C.*, **268**: 1501(1993)
CaMK	Glycogen synthaseに由来するCa^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ（CaMK Ⅱ）およびPKCの優れた基質です。 PKCのKmは約4.1μMです。	*Biochem. J.*, **268**: 303 (1990), *J. B. C.*, **262**: 772 (1987), *J. B. C.*, **260**: 14471 (1985)
MAPK	PKCの天然基質であるneurograninに由来するPKCの合成基質です。特にPKCに特異性が高いことが調べられています （Km=150nM）。PKAやCaMK Ⅱ等にはあまりリン酸化を受けないことが報告されています。	*Biophys. J.*, **72**: 554 (1997), *Biochemistry*, **32**: 1032 (1993)
	PKG特異的基質です。PKG Ia（Km=226μM）に比べ、PKG Ⅱ（Km=84μM）への反応性に優れます。	*Cell*, **112**: 77 (2003), *J. B. C.*, **274**: 3485 (1999)
	PKG特異的基質です。PKG Ⅱ（Km=305μM）に比べ、PKG Ia（Km=59μM）への反応性に優れます。	*J. B. C.*, **274**: 3485-95 (1999), *J. B. C.*, **221**: 581-93 (1994)
	ウシ肺cGMP-specific phosphodiesterase（cG-BPDE）に由来する基質です。PKA（Km=320μM）に比べPKG（Km=68μM） に対する選択性が高く、PKCやCaM kinase Ⅱによってはリン酸化を受けません。	*J. Pharmacol. Exp. Ther*, **283**: 885 (1997), *J. B. C.*, **258**: 11391 (1983)
	Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase（CaMK）特異的な基質です。	*Brain Res.*, **962**: 41 (2003), *Brain Res.*, **851**: 54 (1999), *J. Am. J. Physiol.*, **274**: E708 (1998)
	CaMK Ⅱに特異的な合成基質です。配列は、autoinhibitory domainとして知られているCaMK Ⅱ pseudosubstrate coreに 由来します。	*J. Appl. Physiol.*, **88**: 352 (2000), *J. B. C.*, **274**: 26199 (1999)
	CaMK ⅡおよびPKC特異的な基質です。ホスホリラーゼキナーゼおよびmyosin light chain kinaseによってリン酸化を受けにくいことが知られています。	*Neurosci. Lett.*, **336**: 121-5 (2003), *B. B. R. C.*, **215**: 861-7 (1995); *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**: 418-25 (1987)
	CaMK Ⅱ（Km=7.5μM）に対する合成基質です。本ペプチドに対する最大活性を得るには、Ca^{2+}とcalmodulinが必要であり、 活性はCa^{2+}濃度に依存します。	*Brain Res.*, **962**: 41 (2003), *J. B. C.*, **265**: 17613 (1990)
	CaMK Ⅱの自己リン酸化部位を含む合成基質です。Native CaMK Ⅱ（Km= 136μM）および活性型フラグメント（Km= 54.3μM） の優れた基質となることが知られています。	*Neurosci. Lett.*, **336**: 121 (2003), *J. B. C.*, **266**: 15391 (1991)
	AKT/PKB/Rac-protein kinaseに対する合成基質です（Km=3.9μM）。このペプチドの存在によりAKTによるHistone H2Bの リン酸化は競合阻害を受けます（Ki=12μM）。	*J. B. C.*, **275**: 36108 (2000), *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 965 (1999)
	Glycogen synthase kinase-3 に由来する合成基質です。AKT1/PKBa、AKT2/PKBb、およびAKT3/PKBgにほぼ同等の特異性を示します。MAPKAP kinase-1およびp70S6Kによってもリン酸化されます。AKT以外にも様々なキナーゼの基質となります。	*B. B. R. C.*, **293**: 1191 (2002), *J. B. C.*, **272**: 30491 (1997), *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 965 (1999)
	CDK1の基質です。	*J. Biochemistry*, **42**: 849-56 (2003), *Cell*, **112**: 243-56 (2003)
	Histone H1 peptide に由来する基質です。CDK5の効果的な基質として働きます（Km=40μM）。	*J. Biochemistry*, **42**: 849-56 (2003), *J. B. C.*, **274**: 9600-6 (1999)
	Simian virus 40 large T antigen配列に由来する基質であり、p34cdc2 の特異的な基質である（Km=74μM）。CaM kinase Ⅱ、Casein kinase Ⅰ/Ⅱ、Glycogen synthase kinase-3、Phosphorylase b kinase、PKA、およびPKCなどのプロテインキナーゼによってはリン酸化を受けません。	*J. B. C.*, **278**: 5062 (2003), *J. Cell. Biochem.*, **45**: 391 (1991)
	Tyrosine hydroxylaseの24-33に対応します。Ser31はMAP kinaseの共通リン酸化サイトです。	*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**: 2365-9 (1992), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**: 265-7 (2002), *Int. J. Impot. Res.*, **14**: 217-25 (2002)
	MAP kinase（ERK1/ERK2およびp44/p42 MAPK）に対する優れた基質です。ERKタンパク質はスレオニン残基をリン酸化します。	*Int. J. Impot. Res.*, **14**: 217, *J. B. C.*, **268**: 7646 (1993), *J. B. C.*, **266**: 15277 (1991)
	GSK-3βによって認識されるPresenilin 1の親水ループドメインに由来する基質です。p38α、p38β、PKC、およびCasein kinase Ⅱには認識されません。	*Mol. Biol. Cell*, **14**: 302 (2003), *J. B. C.*, **276**: 7366 (2001)
	Casein kinase Ⅰ特異的基質です（Km:172μM）。Vmaxはカゼインを基質とした場合に比べ約6倍高く、Casein kinase Ⅱによるリン酸化は無視できるレベルです。	*B. B. R. C.*, **198**: 898 (1994), *Cell Mol. Biol. Res.*, **40**: 383 (1994)
	Casein kinase Ⅱ特異的基質です。Casein kinase Ⅰによってはリン酸化を受けません。150mM NaClの存在下で良好なキネティクスを示し、その時のKmは約60μMです。	*J. B. C.*, **278**: 4474 (2003), *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**: 289 (1994); *B. B. R. C.*, **198**: 898 (1994)
	CDCの26-20に由来する基質です。様々なチロシンキナーゼの幅広い基質となります。	*J. Cell Physiol.*, **194**: 13 (2003), *Clin. Cancer Res.*, **9**: 516S (2003), *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**: 587 (1995)
SRC	EGFR protein tyrosine kinaseの基質です。CaMKの基質としても使用されることがあります。	*Cell*, **80**: 225 (1995), *Nature*, **373**: 573 (1995)
SRC	pp60srcに由来する基質であり、様々なチロシンキナーゼの基質として使用されます。	*J. Cell Physiol.*, **194**: 13 (2003), *Clin. Cancer Res.*, **9**: 516S (2003), *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**: 587 (1995)
	Src-family チロシンキナーゼ特異的基質です。p60c-srcに対するKmは55μMである。これは、p34cdc2に由来する基質 [cdc2（6-20）, KVEKIGEGTYGVVYK]に比べ約6.4倍低い値です。	*Int J. Pept. Protein Res.*, **45**: 587-92 (1995), *Harvey Lect.*, **94**: 81-119 (1998)
	Insulin receptorチロシンキナーゼ（INSR）の基質です。	*Eur. J. Biochem.*, **226**: 525 (1994)

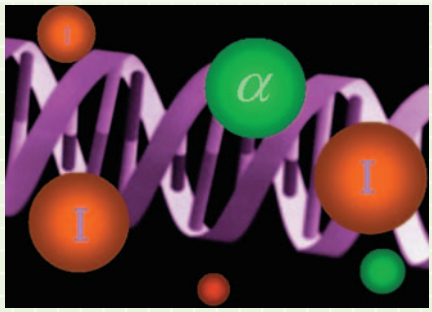
Blend Taq®

品名	包装	Code No.	価格
Blend Taq®	50Units × 1本	BTQ-101T	¥5,000
	250Units × 1本	BTQ-101	¥19,000
	1,000Units × 1本	BTQ-102	¥62,000
	1,000Units × 3本	BTQ-103	¥170,000
Blend Taq® -Plus- (Hot Start Version)	50Units × 1本	BTQ-201T	¥6,000
	250Units × 1本	BTQ-201	¥21,000

次世代の改良型Taqポリメラーゼです。幅広いターゲットを効率良く、確実に増幅できます。

PCR酵素の新スタンダード

1 Blend Taq®を用いたPCR実施例



はじめに

今日、各社より様々なPCR用酵素が販売されていますが、それらは主にPol I型、α型、および混合型に大別できます。なかでもTaqに代表されるPol I型酵素は、優れたDNA合成能を持つことから、PCR技術発明当初より幅広く使用されています。しかしながら、Pol I型酵素には3'→5'Exonuclease (Proofreading) 活性がないことから、間違った塩基を取り込んでしまった場合には伸長反応がストップし、その結果として、増幅できるターゲットのサイズや増幅量には限界があることが知られています。一方、KODやPfuに代表されるα型の酵素は、3'→5'Exo活性を有し、間違って取り込んだ塩基を除去・修復することができます。しかし、その強いExo活性故にPCR効率の点では一般的にPol I型に劣ると言われています。そこで、Pol I型酵素に微量のα型酵素を加えることにより両者の欠点を補い、長所を合わせ持つようにしたのが混合型の酵素です。

Blend Taq®及びBlend Taq®-Plus-は、Taq DNAポリメラーゼをベースにα型酵素を最適な割合でブレンドした混合型酵素です。α型酵素の種類及びそのブレンド比を徹底的に検討することにより、増幅効率、伸長性において非常に優れたものとなっています。さらに、Blend Taq®-Plus-においては、抗Taqモノクローナル抗体により、簡便にホットスタートPCRを行うことができ、高い特異性が得られます。

今回は、本酵素の持つこれらの特長についてご紹介いたします。

方　法

反応は、取扱説明書に従い、以下のようにPCR mixtureを調製しました。

D.W.	33.5（μl）
10×Buffer for Blend Taq®	5
2mM dNTPs	5
Primer F（10μM）	1
Primer R（10μM）	1
Template DNA（5～200ng）	4
Blend Taq®（2.5units/μl）	0.5
Total	50μl

PCRサイクルは、基本的に以下の表に従い実施しました。すなわち、6kb未満のターゲットに対しては3ステップで、6kb以上のターゲットに対しては2ステップのサイクルを用いました。さらに10kb以上のターゲットの場合は、dNTPの終濃度を0.3mMにして実施しました。

Segment	Target			Number of Cycles
	<1kb	1kb～6kb	>6kb	
1	94℃ 2min.			1
2 Denaturation	94℃ 30sec.*1			30
3 Annealing	Primer Tm-5℃ (55～60℃) 30sec.		68℃ 1min./kb PCR target*2	
4 Extension	72℃ 1min.	72℃ 1min./kb PCR target		

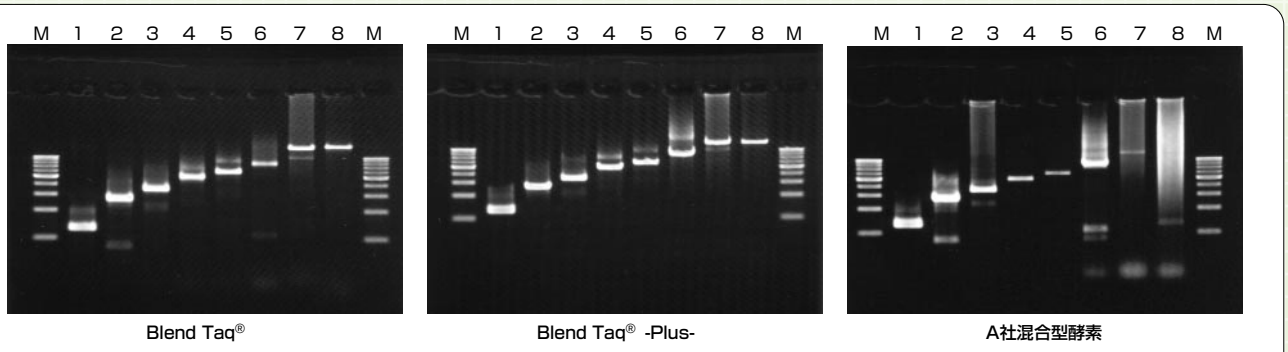
*1：ターゲットによっては、98℃、5～10秒の条件にて良好な結果が得られる場合もあります。
*2：6kb以上の長いターゲットの場合はプライマーのTmが70℃以上になるように設計します。

結　果

1. 種々のサイズの遺伝子をターゲットとした伸長性の評価

Human β-globin遺伝子あるいはhuman myosin heavy chain遺伝子をターゲットとして、種々のサイズの増幅を試みました。鋳型にはヒトゲノムDNA100ngまたは200ngを使用しました。また、同時に、比較のため他社混合型酵素を用いて、その推奨条件にてPCRを行いました。

その結果、Blend Taq®およびBlend Taq®-Plus-では、ターゲット長が23.0kbでも良好な増幅が見られ、他社混合型酵素と比べて優れた伸長性を示すことが確認できました（図1）。また、Blend Taq®で認められる若干の非特異的増幅バンドがBlend Taq®-Plus-では見られず、ホットスタートの効果も確認できました。



Blend Taq®　　Blend Taq® -Plus-　　A社混合型酵素

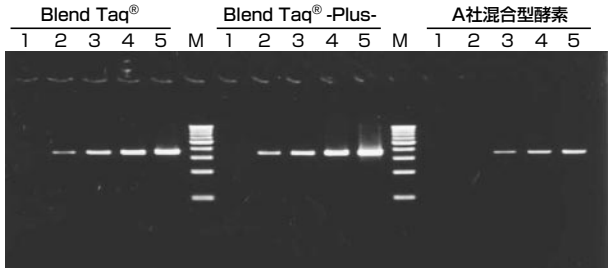
Lane M : 1kb DNAラダーマーカー
Lane 1 : β-globin 1.3kb　　Lane 5 : Myosin h.c. 6.2kb
Lane 2 : β-globin 2.7kb　　Lane 6 : β-globin 8.5kb
Lane 3 : β-globin 3.6kb　　Lane 7 : β-globin 17.5kb
Lane 4 : Myosin h.c. 5.2kb　　Lane 8 : β-globin 23.0kb

図1．種々のサイズの遺伝子をターゲットとした伸長性の評価

2. 微量サンプルを鋳型とした増幅効率の評価

ヒトゲノムDNAを段階希釈したものを鋳型として、Human β-globin遺伝子3.6kbの増幅を試みました。

その結果、Blend Taq® 及びBlend Taq® -Plus-では、ゲノムDNA 5ngを鋳型とした場合でも明瞭な増幅を確認でき、他社混合型酵素と比べて優れた増幅効率を示すことが確認できました（図2）。



Lane M : 1kb DNAラダーマーカー
Lane 1 : Templateなし
Lane 2 : ゲノムDNA 5ng
Lane 3 : ゲノムDNA 10ng
Lane 4 : ゲノムDNA 20ng
Lane 5 : ゲノムDNA 40ng

図2．微量サンプルを鋳型とした増幅効率の評価

まとめ

以上、本コーナーでは、Blend Taq®の優れた伸長性および増幅効率についてお示ししました。また、本酵素は、TaqベースのPCR酵素であるため、Taqと同じサイクル条件を適用でき、PCR産物のTAクローニングが可能なことも特長です。なお、Blend Taq®は、Taqの3～4倍の正確性を持っていますが、さらに正確性を要する用途には、弊社のHigh Fidelity酵素KOD、KOD -Plus-もしくはKOD -Plus- Ver.2を用いられることをお奨めします。

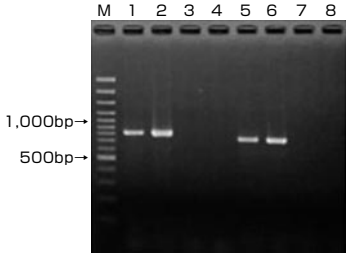
最後に、Blend Taq®を使用された先生方からいただいたPCR実施例をご紹介させていただきます。紙面の都合上、一部しかご紹介できませんが、多くの先生方にご好評いただいています。反応条件等の詳細は、http://www.toyobo.co.jp/bioをご覧ください。

参考文献

Barns,W.M.,*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*,**91**:2216-2220（1994）

ユーザーの先生方からご提供いただいたBlend Taq®使用例

マガキのミトコンドリア領域のPCR

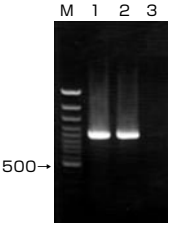


マガキ（*Crassostres gigas*）ミトコンドリア領域A　1−4
マガキ（*Crassostres gigas*）ミトコンドリア領域B　5−6

Lane　M : 100bpラダーマーカー
Lane 1、5 : Blend Taq®　0.050U/10μl
Lane 2、6 : A社混合型酵素　0.125U/10μl
Lane 3、7 : A社混合型酵素　0.050U/10μl
Lane 4、8 : A社混合型酵素　0.025U/10μl

資料ご提供：
長崎大学大学院生産科学研究科
博士後期課程　沖本 宜音先生
宮崎大学大学院農学研究科
水族生理学分野　荒西 太士先生

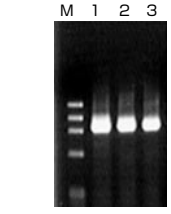
PC12細胞からの細胞分化因子のRT-PCR



Lane M : 100bpラダーマーカー
Lane 1 : Blend Taq®
Lane 2 : Blend Taq® -Plus-
Lane 3 : A社混合型酵素

資料ご提供：
大阪府立大学大学院
農学生命科学研究科 獣医学専攻
細胞分子生物学研究室
竹中 重雄先生

ES細胞からのRT-PCR



Lane 1 : Blend Taq® -Plus-
Lane 2 : Blend Taq®
Lane 3 : A社混合型酵素

資料ご提供：
大阪大学微生物病研究所
遺伝子動態研究分野

2 Blend Taq®およびKOD Dash®を用いるコロニーダイレクトPCR

はじめに

Blend Taq®およびKOD Dash®は混合型PCR用酵素であり、優れたパフォーマンスが必要なPCRに幅広く応用することができます。今回、一般的な研究室において最も頻繁に行われていると予想される、大腸菌コロニーを直接鋳型とするインサートチェックPCRへ本酵素を応用した例をご紹介いたします。それぞれの酵素には、以下のような特性があり、それぞれの用途に応じて使い分けることで、最適な結果を得ることが可能です。

	Blend Taq®	KOD Dash®
説　明	高度に精製されたTaq DNAポリメラーゼに3'→5'Exonuclease活性を有するDNAポリメラーゼを最適な混合比でブレンドすることにより、優れたパフォーマンスを実現した高効率DNAポリメラーゼ。	3'→5'Exonuclease活性を欠損させたKOD DNAポリメラーゼをベースとして、KOD DNAポリメラーゼを混合した高効率DNAポリメラーゼ。合成速度に優れ、かつ安定なKOD DNAポリメラーゼの利点を継承している。
特　長	①確実 ②Taq DNAポリメラーゼ感覚で条件を設定可能 ③安価（¥19,000 / 250U） ④場合によっては、ホットスタート可能なBlend Taq® -Plus- を使用することも可能。	①確実 ②短時間増幅（伸長時間30sec. / 1kb） ③PCR溶液とした後、そのまま凍結保存し、何度も凍結融解しながら使用することが可能。

方　法

コロニーダイレクトPCRの推奨反応条件を図1に、操作フローを図2に示しました。

今回は、弊社TAクローニングキット:TArget Clone™を用いて、pTA2 Vectorに4.5kbのPCRプロダクトをクローニングした後、コロニーダイレクトPCRを行って、インサートの有無を確認しました。比較のため、同一コロニー（宿主はJM109使用）についてBlend Taq®およびKOD Dash®を用いて増幅を実施し、5μlを1%アガロースゲルにて解析しています。プライマーおよびPCRサイクルは図1および下記に示した条件を用いました。

〈Primer配列〉
F primer：TCGAGGTCGACGGTATCGAT（20mer GC＝55%）
R primer：CGCTCTAGAACTAGTGGATC（20mer GC＝50%）
※プライマーはベクター上に設計

〈アニーリング温度および伸長時間〉
Blend Taq® アニーリング：55℃、伸長時間：4.5min.
KOD Dash® アニーリング：60℃、伸長時間：2.5min.

Blend Taq®

	（1サンプル分）	（　　）サンプル分
D.W.	21.9（μl）	（　　）□
10×Buffer for Blend Taq®	3	（　　）□
2mM dNTPs	3	（　　）□
Forward primer（10pmole/μl）	0.9	（　　）□
Reverse primer（10pmole/μl）	0.9	（　　）□
Blend Taq®	0.3	（　　）□
Total	30（μl）	30μlずつ分注

94℃ 4min. → 94℃ 30sec. → 30sec. A℃ → 72℃ Bmin.（1min./1kb）
（Tm−5〜10℃）
×30 cycles

KOD Dash®

	（1サンプル分）	（　　）サンプル分
D.W.	23（μl）	（　　）□
10×KOD Dash® buffer	3	（　　）□
2mM dNTPs	3	（　　）□
Forward primer（10pmole/μl）	0.35	（　　）□
Reverse primer（10pmole/μl）	0.35	（　　）□
KOD Dash®	0.3	（　　）□
Total	30（μl）	30μlずつ分注

94℃ 4min. → 94℃ 30sec. → 5sec. A℃ → 72℃ B sec.（30sec./1kb）
（Tm〜Tm−5℃）
×30cycles

図1．それぞれの酵素におけるコロニーダイレクトPCRの反応条件

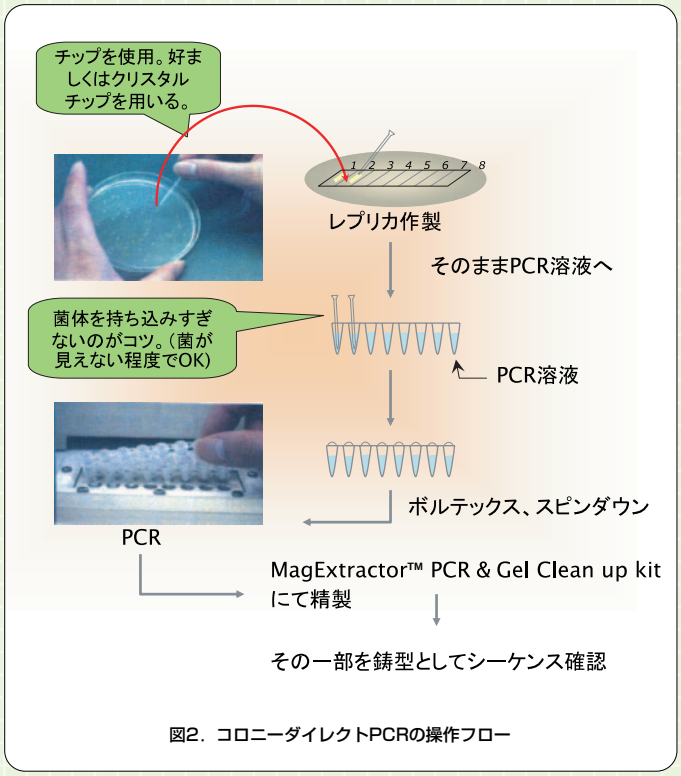
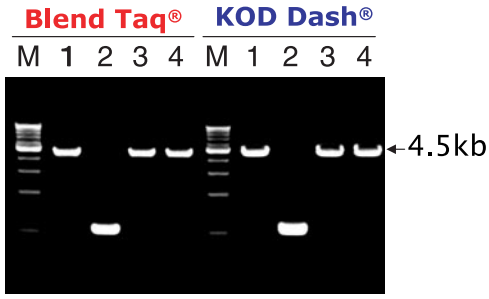


図2．コロニーダイレクトPCRの操作フロー



Lane　M：1kbラダーマーカー
Lane 1～4：各コロニー

図3．PCR結果

結果及び考察

4つのコロニーにおいて、いずれも良好な結果を得ることができました。3コロニーにインサートが挿入されていたことが確認できます。プライマーダイマーの生成はほとんど確認できませんでした。またデータは示しませんが、精製後のシーケンス解析結果も良好でした。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD Dash®	250U×1本	-20℃	LDP-101	¥25,000
TArget Clone™	10回用	-20℃	TAK-101	¥12,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
Mag*ical Trapper*　【磁性スタンド】	1個	室温	MGS-101	¥38,000

Asterand

Asterand社ヒト病理組織

世界各地の提携先より提供された様々な病理組織を、厳密な品質管理の下、詳細な臨床データを添えてお届けいたします。

充実のラインナップ

世界各国40ヶ所以上の提供先から提供された病理組織を臨床データを添えて約10万サンプル（2004年末現在）保有しております。お客様のご要望にマッチしたサンプルを検索し、ご提供いたします。事前に各検体のHE画像、RNAの品質、既住歴、投薬歴などの臨床データをご覧いただけます。

豊富な保存形態・関連試料

凍結切片、パラフィン包埋切片（FFPE）の他、血清、血漿、RNA、DNAもお届け可能です。

※詳細につきましては右記ホームページにてご覧いただくことができます。http://www.asterand.com

倫理面での厳格な対応

これらの検体は、研究、臨床開発用途での使用を目的とした試料、関連情報の提供、保有に適応されるすべての法律、規則、ガイドラインに従って入手、提供されています。

1) すべてのサンプルでインフォームドコンセントが得られています。
2) すべてのサンプルで2度にわたる匿名化が行われています。
3) サンプルの分譲にあたっては、弊社とのMTA（Material Transfer Agreement）の締結及び、御使用される施設の生命倫理委員会での承認が必要になります。

TOYOBO

Toxi-Blocker™ Transfection Supplement

上市キャンペーン 40%off

トランスフェクション時に生ずる細胞毒性を低減するための試薬の登場です。

Toxi-Blocker™は、核酸を動物細胞にトランスフェクションする際に生ずる細胞毒性（Toxi）をブロック（Block）し、生存率を向上させる添加剤（Supplement）です。

特長1 簡便

・実験方法は、トランスフェクション後に、Toxi-Blocker™を添加するだけです（図1）。
トランスフェクション条件は変更の必要がありません。
・多くの場合において、遺伝子導入効率を低下させることなく、生存率を高めることができます。

※本品は、トランスフェクションの補助的な働きはしますが、遺伝子導入効率を高める効果はありません。

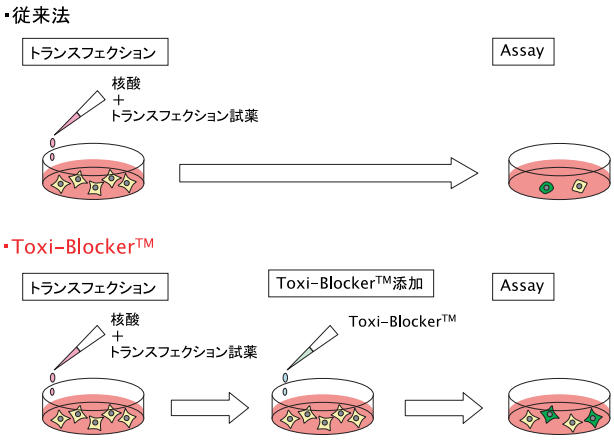


図1．Toxi-Blocker™を用いた実験フロー

実施例1 Neuro 2a細胞での検討結果

Neuro 2a細胞を対象に、Lipofectamine™ 2000（Invitrogen社製）を用い、β-gal発現plasmidをトランスフェクションしました。トランスフェクションの6時間後にToxi-Blocker™を添加し、更に2日間培養後、β-gal染色を行いました（図2）。

従来法（Toxi-Blocker™未添加）では、効率のよい遺伝子導入が見られましたが、強い細胞毒性が現れていました。一方、Toxi-Blocker™を添加することにより、従来法で見られた細胞毒性を大幅に低減することが可能でした（図3）。また、遺伝子導入効率は、従来法とほぼ同等であったことを確認しています。

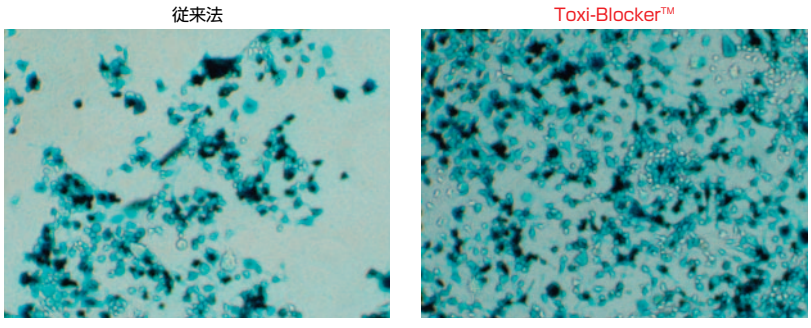


図2．遺伝子導入結果

［β-gal染色］

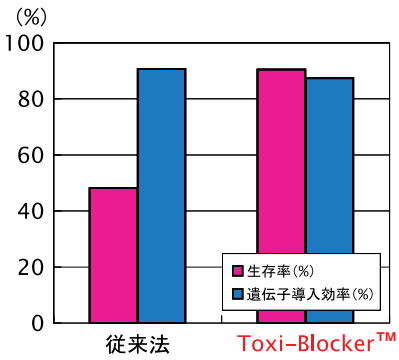


図3．生存率と遺伝子導入効率

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
Toxi-Blocker™ Transfection Supplement	1ml	4℃	TFP-101	¥22,000	¥13,200*

＊本製品は、2006年4月20日～2006年5月19日（御注文分）の間、40%offにてご購入頂けます。

本コーナーでは、この実験をするためにはどの試薬を用意し、どの様に実験を進めればよいかをご案内いたします。
皆さまの日々の実験にご参考ください。

MultiReporter Assay System -Tripluc®- を用いるマルチ遺伝子発現制御解析

多色同時測定可能な新時代のマルチレポーターアッセイシステムです。

はじめに

レポーター遺伝子を用いる遺伝子発現制御解析は、レポーター遺伝子にシス作用性エレメント（プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど）を連結して細胞に導入し、ある条件下で発現されるレポーター酵素の活性を指標に遺伝子発現制御を評価する手法です。この方法で問題となるのは、遺伝子導入効率、細胞数、生育状態など遺伝子発現の変動に起因しない、サンプル間のバラツキが生じてしまうことです。そのため、被験対象となるレポーターの他に、内部標準となるレポーターが必要です。さらに、生命現象の発現において、様々な遺伝子が関与していることからも、複数のレポーターを用いた解析は有効なツールと考えられます。

弊社では、緑色発光ルシフェラーゼ（SLG、最大発光波長550nm）、橙色発光ルシフェラーゼ(SLO、580nm)、赤色発光ルシフェラーゼ（SLR、630nm）の3色のルシフェラーゼ遺伝子を用いたマルチ遺伝子転写活性測定システムMultiReporter Assay System -Tripluc®-を販売し、ご好評をいただいております。本稿では、あらためて本システムを用いた遺伝子発現制御解析について、実験のフローに沿ってご紹介させていただきます。

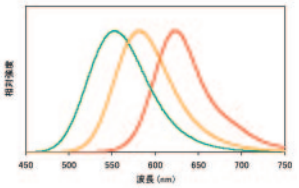


図1．緑色・橙色・赤色発光ルシフェラーゼの発光スペクトル

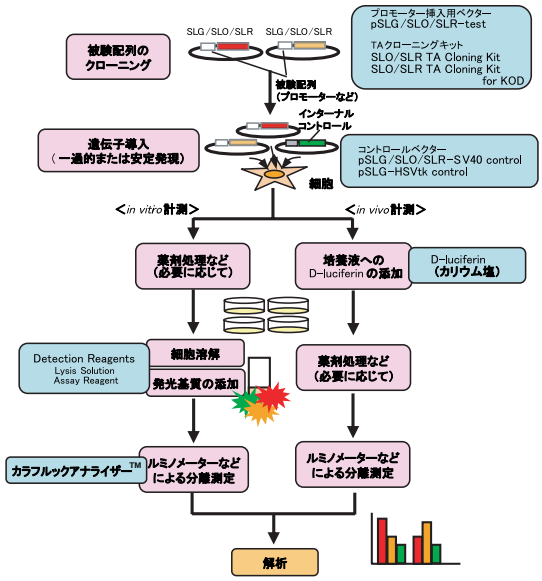


図2．MultiReporter Assay System -Tripluc®-を用いた遺伝子発現制御解析のフロー

被験配列のクローニング

(1) ルシフェラーゼの選択

MultiReporter Assay System -Tripluc®-では、3色の発光ルシフェラーゼをご用意しております。勿論、同時に調べたい被験配列（シス作用性エレメント）の数などによって、1色あるいは様々な組合せで2色のルシフェラーゼだけでもご使用いただけます。表1に選択の目安をまとめていますのでご参照ください。

1色でご使用いただく場合は、SLGないしSLOルシフェラーゼをご使用ください。酵素及び測定機に用いられる光電子増倍管の特性上、SLRに比べ強いシグナルを取得することが可能です。

2色でご使用いただく場合は、発光波長域の重なりの少なく、より精度の高い計測を行うことのできる、SLG、SLRの組合せをお薦めします。シグナル強度などによりSLRでは解析が難しい場合には、SLGと被験配列・内部標準の組合せを入れ替えて使用するか、SLOを用いることも可能です。

3色でご使用いただく場合には、被験配列をSLO、SLRに、内部標準をSLGとして用いることをお薦めします。シグナルの強いSLGを内部標準として用いることによって、内部標準プラスミドの添加量を低く抑えることができます。

また、サーカディアンリズムや刺激応答など、ダイナミックな遺伝子変動を解析する場合には、近日発売予定の不安定化ルシフェラーゼ（-short lifeタイプ-）をご利用ください。

(2) TAクローニング

被験配列挿入用ベクターには、各レポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子の上流にマルチクローニングサイトを含むスタンダードタイプの他にTAクローニングタイプもあります。

TAクローニング法は制限酵素処理等を必要としないため、PCR産物を効率的にクローニングすることが可能です。弊社では、このTAクローニング技術をプロモーター解析にもご利用いただくべく、SLO/SLR TA Cloning Kitとしてご提供しております。

また、SLO/SLR TA Cloning Kit for KODは、高フィデリティー酵素の特性上平滑末端産物を生じやすく、TAクローニングを苦手とするKODシリーズのPCR産物においても、簡便にTAクローニングが行えるように工夫されたキットです。

プロモータースクリーニングなどを目的として、多くの種類の遺伝子プロモーターを同時にクローニングしたい場合、あるいは転写活性機能部位の特定のために特定プロモーターデリーションシリーズなどを作製されたい場合など、効率的なクローニングにご利用いただけます。

遺伝子導入

通常よく用いられる1色系のアッセイでは、単に被験配列をクローニングしたベクターを用いて比較を行いますが、本システムではサンプル間のバラツキを補正するため、内部標準となる一定発現プロモーターに連結されたルシフェラーゼ遺伝子を有する、内部標準ベクターを同時トランスフェクションするアッセイをお奨めしています（2色系や3色系による同時解析）。MultiReporter Assay System -Tripluc®-では構成発現プロモーターベクターとして、SV40プロモーターまたはHSVtkプロモーターをレポーターの上流に組み込んだ、2種類の内部標準用ベクターをご用意しております。

表1．レポーターの選択の目安

	1色系 （被験配列 1、内部標準 0）	2色系 （被験配列 1、内部標準 1）	3色系 （被験配列 2、内部標準 1）
被験配列挿入用ベクター （制限酵素を用いてクローニングする場合）	**pSLG-test** (Code No. MRV-101)	**pSLR -test** (Code No. MRV-103) ＊被験配列の転写活性が弱い場合 **pSLG-test** (Code No. MRV-101)	**pSLO-test** (Code No. MRV-102) **pSLR-test** (Code No. MRV-103)
被験配列挿入用ベクター （TAクローニングする場合）	**SLO TA Cloning Kit** (Code No. MRT-101) ＊KODシリーズを用いる場合 **SLO TA Cloning Kit for KOD** (Code No. MRT-201)	**SLR TA Cloning Kit** (Code No. MRT-102) ＊KODシリーズを用いる場合 **SLR TA Cloning Kit for KOD** (Code No. MRT-202) ＊被験配列の転写活性が弱い場合 **SLO TA Cloning Kit** (Code No. MRT-101) **SLO TA Cloning Kit for KOD** (Code No. MRT-201)	**SLO TA Cloning Kit** (Code No. MRT-101) **SLR TA Cloning Kit** (Code No. MRT-102) ＊KODシリーズを用いる場合 **SLO TA Cloning Kit for KOD** (Code No. MRT-201) **SLR TA Cloning Kit for KOD** (Code No. MRT-202)
内部標準用ベクター	–	**pSLG-SV40** (Code No.MRV-201) または **pSLG-HSVtk** (Code No.MRV-301) ＊被験配列の転写活性が弱く、被験配列挿入にpSLG-testを用いる場合 pSLR-SV40(Code No. MRV-203)	**pSLG-SV40** (Code No.MRV-201) または **pSLG-HSVtk** (Code No.MRV-301)

(1) SV40プロモーター

発現活性が高いため、トランスフェクション効率の低い細胞株を用いる場合など、シグナルのレベルに問題がある場合に特に有効です。

(2) HSVtkプロモーター

発現活性が低い一方、SV40プロモーターに比べ薬剤などの実験処理により変動する可能性が低く、より安定した内部標準として有用です。

計　測

(1) *in vivo*計測（非破壊計測）

ルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞の培養液中にD-luciferinを添加して細胞内へ浸透させ、細胞を破壊することなく、ルシフェラーゼ活性を計測する方法です。*In vitro*計測と比較してシグナル強度は低くなりますが、同一サンプルで転写活性の経時変化を調べたい場合に有効です。インキュベーター機能付ルミノメーター（ATTO社「クロノス」など）を用いることによって、さらにリアルタイムな変動を解析することが可能です。

(2) *in vitro*計測（破壊計測）

MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagentを用いて検出します。

ルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞を必要に応じて薬剤刺激処理した後、培地を除去し、溶解剤Lysis Solutionで細胞を溶解し、このライセートに発光基質Assay Reagentを加え、発光を測定します。サンプル数が少ない場合にはライセートの一部をとり、発光基質を加え、カラフルックアナライザー™のような色分離機能つきチューブタイプのルミノメーターで測定を行うことができます。一方、サンプル数が多い場合には、白色不透明タイプの96ウェルプレートに細胞を培養し、このプレートのまま、Lysis Solutionによる細胞の溶解、Assay Reagentによる検出・測定を行います。この96ウェルプレートの使用例については、次号のUploadにてご紹介する予定です。

最後に、次項に2色系および3色系において、*in vitro*計測によって遺伝子発現制御解析を行った例をご紹介いたします。是非、一度MultiReporter Assay System -Tripluc®- をお試しください。

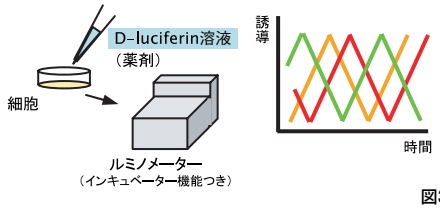


図3．*in vivo*計測

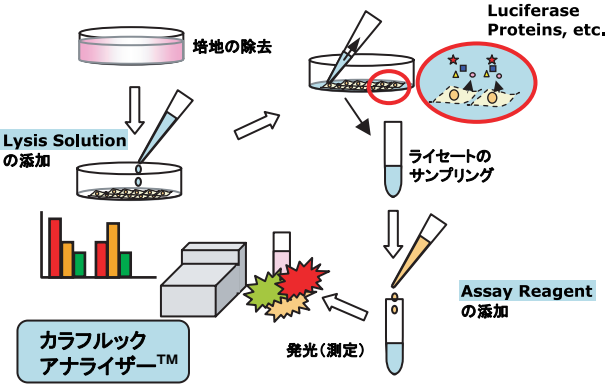


図4．*in vitro*計測（チューブ測定）

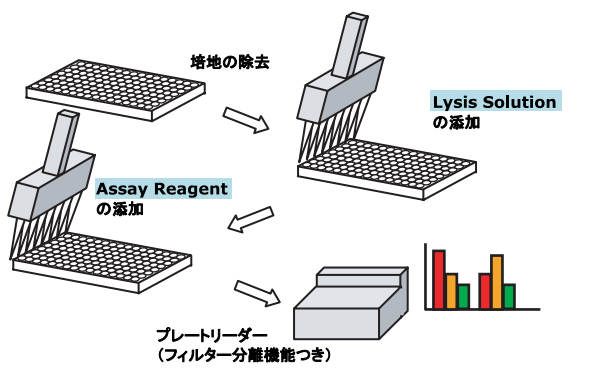
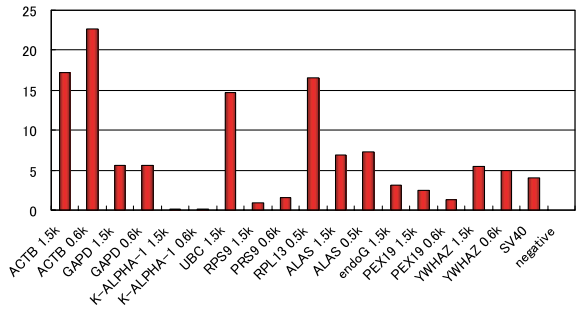


図5．*in vitro*計測（プレートリーダー測定）

使 用 例

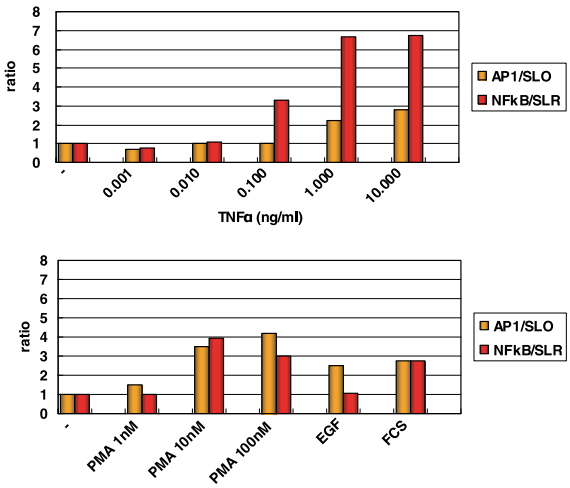
1. 2色系での使用例

ハウスキーピング遺伝子として知られる10種類の遺伝子について、転写開始（予測）点より上流1.4kbまたは0.5 kbから下流0.1kbをKOD plusでPCR増幅し、SLR TA Cloning Kit for KODを用いてSLR遺伝子上流にクローニングし、pSLG-SV40 controlとJurkat細胞にコトランスフェクションした。細胞を遠心操作で回収後、Detection Reagentsで検出し、内部標準であるSLGに対する相対活性として各遺伝子プロモーターの転写活性を評価しました（詳細は、Upload80号、P.13、14に掲載されておりますので、合わせてご参照ください）。



2. 3色系での使用例

pSLO-test、pSLR-testの上流にSV40プロモーター、さらに上流にAP1またはNFκB応答エレメントを挿入した。これら2つを内部標準HSVtk-SLGとともにHeLa S3細胞にトランスフェクションした。
24時間後、下記の薬剤を添加し、3時間インキュベートした。
Detection Reagentsで検出し、未処理条件のルシフェラーゼの活性を1として、各条件でのルシフェラーゼの活性をプロットしました



参考文献

1. *バイオテクノロジージャーナル*, 7-8: 453-455 (2005)
2. *Biotechniques*, **38**: 891-894 (2005)

関連商品

品 名 及 び 内 容	包 装	保存温度	Code No.	価 格
プロモーター挿入用ベクター pSLG-test	20μg	-20℃	MRV-101	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLO-test	20μg	-20℃	MRV-102	¥80,000
プロモーター挿入用ベクター pSLR-test	20μg	-20℃	MRV-103	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLG-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-201	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLO-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-202	¥80,000
SV40コントロールベクター pSLR-SV40 control	20μg	-20℃	MRV-203	¥80,000
HSVtkコントロールベクター pSLG-HSVtk control	20μg	-20℃	MRV-301	¥80,000
SLO TA Cloning Kit	20回用	-20℃	MRT-101	¥65,000
SLR TA Cloning Kit	20回用	-20℃	MRT-102	¥65,000
SLO TA Cloning Kit for KOD	20回用	-20℃	MRT-201	¥69,000
SLR TA Cloning Kit for KOD	20回用	-20℃	MRT-202	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vitro*アッセイ用試薬 **Detection Reagents** ・Lysis Solution ・Assay Reagent	100回用 500回用 10,000回用	-80℃	MRA-101 MRA-102 MRA-103	¥30,000 ¥99,000 ¥1,350,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vivo*アッセイ用試薬 **D-luciferin（カリウム塩）**	20 mg 100 mg	-20℃	MRL-101 MRL-102	¥24,000 ¥92,000
カラフルックアナライザー™	1式	−	CLX-101	¥1,350,000

※特許の関係上、ご購入の際には別途申込書を提出していただきます。企業の方のご購入に関しては、別途ライセンスが必要です。詳しくは弊社までお問い合わせください。
※ベクターに関しては別途セット販売をしております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。

みんなの広場

皆様から実験のコツ、成功・失敗談を募集いたします！

今回、新企画として『みんなの広場』というコーナーを始めさせていただくことになりました。皆様の日々の研究の中で、「こうやったら実験がうまくいった。皆この方法を使えばいいのに・・・」とか、逆に「あの方法には、実は○○○○○○という欠点が潜んでいる。他の人が失敗しないように、伝えたいのだけれど・・・」といった潜在的な要望をお持ちの方はいらっしゃいませんか?このような事例は論文として発表されることはほとんどありませんが、皆様の研究に大きな影響を及ぼしていることも多々あると予想されます。このコーナーは、そのような皆様の事例を掲載させていただくことで、今まで共有できなかった種類の情報を共有することを目的とします。

多くの皆様のご投稿をお待ちしております。

募集要項

投稿方法

Web上から受け付けております。弊社ホームページ（URL：http://www.toyobo.co.jp/bio）へアクセス願います。

原稿内容

・文字数の目安：100～400文字程度
（あまり文字数が多い場合には、ご相談させていただくこともございます。）
・画像やグラフなどの添付も可能
（Powerpointもしくは Wordのファイルにてお願いいたします。また、使用されました写真等につきましてはできればJPGやTIFの原画も添付ください。）

※「このキットを使ったらうまくいった」というような事例ではなく、個人的な工夫や一般性の高い事例に限らさせていただきます。
※ 記事掲載は出版行為とみなされますので、特許出願などが絡む可能性のある案件は一度確認してからご投稿ください。

賞品

毎号*、採用された方にもれなく図書カード¥10,000分を進呈いたします。

今回は、**オープニング記念**として応募していただいた方の中から
抽選にて10名様に図書カード¥5,000分を進呈いたします。
この機会に是非ご応募ください。

＊：掲載は編集の関係で、投稿いただいた順番が前後することがございます。
予めご了承ください。

〈掲載例〉

Report of research

SDS-PAGE時のスマイリング対策

△△△大学・○○学部・学生
××××さんからのご投稿（匿名でも結構です）

SDS-PAGEでタンパク質を解析するときにスマイリングが問題になっていたのですが、処理したサンプルに△△mMの○○を××%添加してアプライすることで、非常にシャープなバンドが得られるようになりました。ちなみに、○○は□□でも代用可能です。注意点は、サンプルをSDS-Dye中で加熱した後に加えることです。

論文に投稿する時など、やはりシャープなバンドが欲しいですよね。
是非一度試してみてください。成功例を載せておきます。

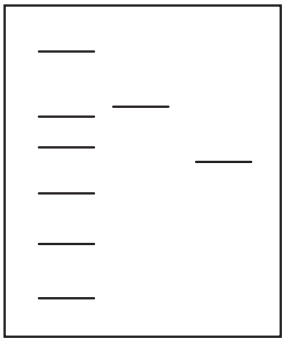


図１．SDS-PAGE解析例

●TOYOBO 各種新カタログ類の発刊のお知らせ

下記３点の発刊をお知らせいたします。資料をご希望の方はお近くの弊社代理店へお問い合わせください。また、弊社ホームページ（http://www.toyobo.co.jp/bio）からもご請求いただくことができます。是非、ご利用ください。

●TOYOBO 2006～2007バイオ総合カタログ
弊社総合カタログ 2006/2007を4月17日に発刊いたしました。

●バイオ機器カタログ 春号
弊社機器カタログ 春号を4月3日に発刊いたしました。

●私にもできたシリーズ
ご好評の私にもできたシリーズですが、新号「遺伝子発現解析編（前編）」を4月20日に発刊いたしました。また、Vol.1の「遺伝子クローニング編」もリニューアルし、同時発刊しております。

●Santa Cruz社 2006カタログ発刊のお知らせ

Santa Cruz社 2006カタログを3月13日に発刊いたしました。ご希望の方はお近くの弊社代理店へお問い合わせください。また、弊社ホームページ（http://www.toyobo.co.jp/bio）からもご請求いただけます。是非、ご利用ください。

ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。
本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である（財）日本適合性認定協会（JAB）に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会（JIC Quality Assurance Ltd.）によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

NOTICE TO PURCHASER ：LIMITED LICENSE

A license under U.S.Patents 4,683,202,4,683,195,4,965,188,and 5,075,216or their foreign counterparts,owned by Hoffmann-La Roche Inc.and F.Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche"), has an up-front fee component and a running-royalty component. The purchase price of this product includes limited,nontransferable rights under the running-royalty component to use only this amount of t he product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") and related processes described in said patents solely for the research and development activities of the purchaser when this product is used in conjunction with a thermal cycler whose use is covered by the up-front fee component. Rights to the up-front fee component must be obtained by the end user in order to have a complete license to use this product in the PCR process. These rights under the up-front fee component may be purchased from Perkin-Elmer or obtained by purchasing an authorized thermal cycler. No right to perform or offer commercial services of any kind using PCR, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted by implication or estoppel. Further information on purchasing licenses to practice the PCR Process may be obtained by contacting the Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404 or at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alamada, California 94501.

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品にには消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号：毒 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。劇 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。危 印は消防法に基づく危険物です。